

NUMBER 25

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

**RESEARCH
COMMUNICATIONS**

2011

RESEARCH COMMUNICATIONS

No. 25



2 0 1 1

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA (IFO)

Published by

INSTITUTE FOR FERMENTATION, OSAKA

17-85, JUSO-HONMACHI 2-CHOME

YODOGAWA-KU, OSAKA 532-8686, JAPAN

公益財団法人発酵研究所

理事長	波多野和徳		
常務理事	中濱 一雄		
理事	大嶋 泰治 武田 光子 中瀬 崇 別府 輝彦	木村 光 富田 房男 古川 謙介 本田 武司	
監事	岡田 将生	田浦 清	
評議員	今田 哲 北本勝ひこ 竹内 昌男 土屋 英子 吉田 敏臣	魚住 武司 下田 親 谷 吉樹 松原 謙一	
顧問	坂野 勲		

目 次

第5回助成研究報告会の開催	1
ベトナムおよびタイの酸性硫酸塩土地帯に生育する植物から単離した 新規植物共生微生物の系統分類学的研究	相澤 朋子 … 5
マイナーポピュレーション解析を含めた口腔内細菌叢の網羅的多様性解析 ならびに分類学的検討	河村 好章 … 19
深海底熱水活動域に優占する難培養性化学合成微生物の遺伝学的分類 および保存法に関する研究	中川 聡 … 31
菌類の遺伝子プロモータ領域におけるクロマチン構造の比較に基づく 系統分類学研究	西田 洋巳 … 41
文化財の生物劣化にかかわる菌類分子群集解析 および DNA バーコードの実用化	安 光得 … 55
微細藻類と共存して培養される難培養細菌の継代培養法 および系統分類に関する研究	大塚 重人 … 69
腸管出血性大腸菌 O157 : H7Sakai の新規 non-coding RNA の 同定と機能解析	相馬亜希子 … 93
インフルエンザウイルスによる糖鎖受容体認識の多様性と 宿主域を規定する分子基盤の解明	鈴木 隆 … 107
変性ポリエチレンテレフタレート分解性好熱菌由来の 分解酵素の解明と利用に関する研究	河合富佐子 … 119

バイオマスに由来する新規ナノ・ハイブリッドファイバーに対する
微生物分解過程の解明……………下坂 誠…129

サルノコシカケ科の分子系統関係の解明と
新規分類形質を用いた分類体系の構築……………早乙女 梢…145

第5回助成研究報告会の開催

平成23年6月8日千里ライフサイエンスセンター5階ホールにおいて第5回助成研究報告会を開催した。今回は平成20～22年度に助成を受けた10名の研究者から3年間に得た研究成果が発表された。参加者は160名であった。

開会に先立ち波多野和徳理事長から冒頭に「本報告会に多数の方々に参加されたことに謝意を表し、加えて3月11日の大震災で被害を受けられた研究者に対しお見舞いを申し上げ、さらに研究資源などを失ったにも拘わらず研究をいち早く再開された研究者に対して心から敬意を表す。」旨の発言があり、続いて次のような趣旨の挨拶がなされた。「当財団は昭和19年から58年間にわたって微生物株等の保存事業を行ってきたが、平成14年に一般微生物株の全コレクションをNBRCに移管した。その後当財団は事業の柱を微生物の研究を助成するための研究資金の提供へと転換した。幸い皆様のご理解とご支援により、順調に事業を進めることができ、本年3月22日に事業内容の公益性が認められて内閣府から新制度における公益財団法人の認定を受けた。これからも微生物研究の助成を通じて社会貢献をしていく所存である。この報告会は研究成果の発表だけでなく、発表者および参加者の間の交流も意図している。報告される研究対象も多岐にわたり、参加者もいろいろな分野の有識者が揃っているので盛んな討議を期待している。また懇親会においても酒を酌み交わしながら議論と交流を深めていただきたい。」

報告会では2つの研究課題のうち研究課題1『微生物の分類学的研究および培養株の保存に関する研究』については中瀬崇理事（理化学研究所名誉研究員）の座長の下に、1. 東南アジア酸性硫酸塩土地帯に生育する植物から単離された新規有用微生物群の系統分類学的研究（相澤朋子）、2. マイナーポピュレーション解析を含めた口腔内細菌叢の網羅的多様性解析ならびに分類学的検討（河村好章）、3. 深海底熱水活動域に優占する難培養性化学合成微生物の遺伝学的分類および保存法に関する研究（中川聡）、4. 菌類の遺伝子プロモータ領域におけるクロマチン構造の比較に基づく系統分類学研究（西田洋巳）、5. 文化財の生物劣化にかかわる菌類分子群集解析およびDNAバーコードの実用化（安光得）、6. 微細藻類と共存して培養される難培養細菌の継代培養法および系統分類に関する研究（大塚重人）の6題の発表があった。次いで研究課題2『健康や環境に関与する微生物の研究』について木村光理事（京都大学名誉教授）の座長の下に、7. 宿主細胞への感染における病原性大腸菌O157株特異的な非翻訳RNAの機能解析（相馬亜希子）、8. インフルエンザウイルスによる糖鎖受容体認識の多様性と宿主域を規定する分子基盤の解明（鈴木隆）、9. 変性ポリエチレンテレフタレート分解性好熱菌由来の分解酵素の解明と利用に関する研究（河合富佐子）、10. バイオマスに由来する新規ナノ・ハイブリッドファイバーに対する微生物分解過程の解明（下坂誠）の4題の発表が行われた。各演者の研究内容は本助成研究報告集に収録されている。それぞれの報告に対して活発な質疑応答がなされ、若い研究者からの発言も多く認められてきわめて有意義で充実し

た報告会となった。

引続いて開催した懇親会には報告会参加者のほとんどが出席した。大嶋泰治理事（大阪大学名誉教授）の挨拶に続き、木村光理事（京都大学名誉教授）の発声による乾杯がなされて、立食式のパーティーが始まった。ここでは研究報告についての追加の質疑などもなされ、異なる分野の研究者間でなごやかに歓談が持たれた。また途中、本年10月に大阪大学大学院工学研究科に設立される予定の当財団寄付講座「酵母ゲノム資源工学」の担当教員金子嘉信（現准教授）から抱負が語られて話題が盛り上がった。報告会と懇親会が異なる領域の微生物研究者の交流の場として役立っているように思われ、開催者として大変有難く思っている。

なお、来年の第6回助成研究報告会は6月7日（木）に同じ会場で開催の予定である。

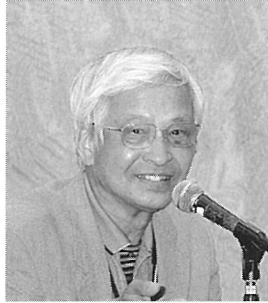
以下に報告会と懇親会の模様の一部を写真で紹介する。

（文）坂野 勲

RESEARCH COMMUNICATIONS



開会挨拶
波多野和徳 理事長



座長 中瀬 崇 理事



座長 木村 光 理事



司会
中濱 一雄 常務理事



相澤 朋子 氏



河村 好章 氏



中川 聡 氏



西田 洋巳 氏



報告会

RESEARCH COMMUNICATIONS



安 光得氏



大塚 重人氏



相馬亜希子氏



鈴木 隆氏



河合富佐子氏



下坂 誠氏



挨拶 大嶋 泰治 理事



乾杯 木村 光 理事



懇 親 会

平成20年度研究助成の研究報告

助成期間：平成20年4月～平成23年3月

ベトナムおよびタイの酸性硫酸塩土壌地帯に生育する植物から 単離した新規植物共生微生物の系統分類学的研究

相澤 朋子

日本大学生物資源科学部応用生物科学科
〒252-0880 神奈川県藤沢市亀井野1866

Characterization and identification of novel symbiotic bacterial species isolated from plants adapted to acid sulfate soil areas of Vietnam and Thailand

Tomoko Aizawa

Department of Applied Biological Sciences, College of Bioresource Sciences, Nihon
University

1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-0880, Japan.

Acid soils are estimated to cover approximately 30% of the Earth's arable land and represent a major limitation to plant production. Acid sulfate soils (ASS) are highly acidic (pH 2-3), and serious destruction of the environment occurs when these soils cover arable land. Below pH 4.5, aluminum becomes more soluble, and a few micronutrients, such as manganese and iron, become more soluble and toxic. Furthermore, most plant nutrients, especially phosphorus, become more limited in acid soils, which situation can cause serious destruction of the environment and significant economic problems. One possible measure is crop production using organisms adapted to highly acidic soils, e.g., the inoculation of symbiotic bacteria into crop plants. We have surveyed plants adapted to highly acidic swamps, ponds, and ditches in ASS areas in Vietnam and Thailand. Bacteria tightly bound to the surfaces of these plants as well as endophytes were isolated. Among these isolates, acid-tolerant strains, nitrogen-fixing strains, pH-neutralizing strains, insoluble phosphate salts-solubilizing strains, and aluminum-tolerant strains were characterized and identified.

We describe four novel *Burkholderia* and *Acidocella* species, *Burkholderia heleia* (SA41^T, SA42, and SA53), *Burkholderia acidipaludis* (SA33^T and 7A078), *Burkholderia bannensis* (E25^T and E21), and *Acidocella aluminiidurans* (AL46^T), isolated from the Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*) and torpedo grass (*Panicum repens*), growing in ASS areas of Vietnam and Thailand.

Key words: acid sulfate soil, acid tolerance, aluminum-tolerant, pH-neutralization, rhizosphere

緒 言

人口増加に伴って食糧増産が世界的課題となっているなかで、耕作に適さない問題土壌の約30%は酸性土壌であるといわれている (Baligar & Ahlrichs, 1998). 一般的な酸性土壌の生成要因としては、多雨であることや無機肥料の過剰投与などが挙げられる。土壌と水を重量比1:2.5で懸濁させた際の水相のpHを指標にした評価法によると、pH 6.6~7.2は中性土壌、pH 6.0~6.5

は微酸性、pH 5.5~5.9は弱酸性、pH 5.0~5.4は強酸性、そしてpH 4.9以下は極めて強酸性であると定義される (後藤, 2001)。茶などを除き、イネ、オオムギ、コムギ、ダイズ、サトウキビ、トウモロコシなどの作物植物は中性付近で最も生育が良い (松坂ら, 1994)。酸性土壌では、強酸性、アルミニウム・重金属などの金属過剰害、リン酸の不溶化によるリン不足、窒素固定菌の活性低下による窒素不足などが複合して植物の生育阻害が起こり、農業上の問題となっている。特に、硫化鉄を多く含む海成粘土層が開墾などにより地表に露出し、これが酸化されて生じる硫酸が原因となり、土壌および周辺水域がpH 1~4という強酸性を示す酸性硫酸塩土壌

(acid sulfate soil: 以降 ASS) と呼ばれる土壌は深刻である。

土壌とはその起源物質である母材(堆積岩, 火成岩, 有機物など)が風化してできたものである。酸性硫酸塩土壌の生成過程は, まず湖底や海底などにおいてパイライト(FeS_2)の生成・蓄積が起きることから始まる(久馬, 1986)。水中でのパイライトなどの硫化物の生成, 蓄積は SO_4^{2-} の供給と有機物の供給による還元的条件が満たされると起こる。海水中には約 2.65 g/l の SO_4^{2-} が存在し, 熱帯・亜熱帯のマングローブ林, 温帯の内湾の湿原ではこれらの条件が重なってパイライトができやすい。そして, 生成したパイライトの水への溶解度は低いため海底や湖底に蓄積する。その結果, 海底堆積物中の還元型イオウ化合物中の全イオウの95%以上, 乾燥堆積物重あたり1~4%, まれには5%以上がパイライトとなる(van Breemen & Pons, 1978)。この蓄積したパイライトを多く含む堆積物が, 海面の後退や地殻変動などにより陸上に現れると潜在的酸性硫酸塩土壌と呼ばれる。そして, 大規模開拓などにより表層土壌が除去されると, パイライトが大気中の酸素により酸化され, これに*Thiobacillus*属細菌や*Ferrobacillus*属細菌などの微生物も作用することによって, 最終的に以下のような反応がおこる。



すなわち, 1モルのパイライトから2モルの硫酸イオンと4当量の酸が生成することにより周辺環境は急激に酸性化し, ASSとなる。ASSは, 世界中に1000万ヘクタール以上, 東南アジアにはその半分が存在するとされている。一方で, 人口が急激に増加している東南アジアでは食糧増産のため稲作を中心としたASSの利用が強く求められているが, 硫酸により土壌および周辺水域が強酸性を示すため, 酸感受性の農作物の生育は困難であり, 耕作を放棄されて荒地になっている地域も多い。

酸性土壌への対策として, 汲上げ水による土壌の洗浄, 石灰による酸の中和等が行われているが, 処理範囲が膨大でポンプの敷設・管理, 大量の石灰の運搬・散布が必要であり, これら対策に多大なコストがかかることから, 導入が難しい場合がある。ASSの場合はさらに深刻で, 仮に3%のパイライトを含むASSを石灰によって中和しようとするれば, 生成する酸の半量を水による洗浄で除去したとしても, 150 万トン/ha の石灰が必要であると試算されている(van Breemen & Pons, 1978)。

そこで, 低コストかつ効率的な新手法, 例えば植物根圏で①酸性環境の中性化②過剰金属の不活化③リン酸の可溶化④窒素化合物の供給などピンポイントで効果を発揮する酸性土壌適応有用微生物の利用などが求め

られている。

一般土壌における微生物を利用した植物生育促進法としては, *Pseudomonas*属細菌などを含む植物生育促進細菌(plant growth-promoting bacteria, PGPB)と呼ばれる微生物群を対象に研究がおこなわれてきている。しかしASSでは, 強酸性, アルミニウム・重金属などの金属過剰害, リン酸塩の不溶化によるリン不足などにより既存のPGPBは適応できない。

そこで, ベトナムのCanTho大学, タイの王立酸性硫酸塩土壌試験場と共同研究を行い, 現地研究者と共に応用可能な植物・微生物共生体を複数年探索した。探索の結果, ASSでは, 限られた種類の植物イネ科のハイキビ(*Panicum repens*)やカヤツリグサ科のシログアイ(*Eleocharis dulcis*)などが生育し, その表面に多数の微生物がバイオフィームを形成して生息していた。これら植物はASSの湿地帯に分布しており, 地上部のほとんどが強酸性の水中に没している。

本研究を開始するに当たり, 報告者らは前述の植物から酸耐性, 生育環境中性化, 金属イオン耐性, リン酸可溶化, 酸耐性窒素固定能などASS適応能をもつ多くの候補株を単離している(相澤, 2008; Aizawa *et al.*, 2008)。これらには分類学的に新規性の高い可能性を持つものが多く, 植物防疫上の観点からも機能解析とともにその分類学的検討が必要であるため, 本報告ではこれら単離株の系統分類学的特徴を明らかにすることを目的とした。

実験方法

使用菌株 ASS適応能をもつ菌株は以下に示す手法で単離・選抜された。微生物の単離源としてはタイ・ナコンナヨおよびベトナム・キエンジャンにて採取した*Panicum repens*と*Eleocharis dulcis*を用いた。採集した植物は, 植物防疫所に届け出をしたうえで周囲の土壌ごと密閉して空輸し, 根圏土壌等を剥ぎ取った後, 以下のように植物表面微生物の取得を行った。植物サンプルを根と茎に切り分け, 生理食塩水中で15分間, 3回振盪し, 表面に緩く付着している微生物や植物体破片の除去を行った。次に, 洗浄した植物を生理食塩水中で約16時間激しく振盪し, 植物表面微生物を剥離した。また, 植物表面微生物を剥離した植物の表面を70%EtOHで30秒間振とうし, 次亜塩素酸ナトリウムで15分間振とうして表面を滅菌した後, 乳鉢ですり潰して得られた液を植物内生菌液とした。

これらの微生物を含む画分を孔径 $0.22 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルター上にトラップし, 平板培地上で植物表面微生物を単離し, 酸耐性, 生育環境中性化, 金属イオン

耐性, リン酸可溶性, 酸耐性窒素固定能など ASS 適応能を指標に選抜した (相澤, 2008; Aizawa *et al.*, 2008).

本研究では, 選抜した ASS 適応能をもつ菌株のうち, 16S rRNA 遺伝子の予備的な塩基配列解析の結果, 新規分類群に属すると予想された *Burkholderia* 属細菌 (SA41, SA42, SA53, SA33, 7A078, E25, E21) および *Acidocella* 属細菌 (AL46) を用い, これらの系統分類学的特徴について詳細に検討を行った。

使用培地 菌株の培養は 1/10 トリプトソイ (TS) 培地 (pH3.5) (Aizawa *et al.*, 2007) を使用した。窒素固定活性の測定は pH3.5 または pH 6.2 の Winogradsky 無窒素培地 (Hashidoko *et al.*, 2002), 金属イオン耐性試験は MT 培地 (Kimoto *et al.*, 2010) を使用した。不溶性リン酸可溶性の判定には, リン酸鉄培地あるいはリン酸アルミニウム培地 (培地 1L 当たり D-グルコース 10g, 塩化アンモニウム 5g, 塩化ナトリウム 1g, 硫酸マグネシウム 7水和物 1g, リン酸第一鉄あるいはリン酸アルミニウム 3g, pH4.0) を用いた。

16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定および系統解析 16S rRNA 遺伝子の塩基配列 (約 1500 bp) の決定はユニバーサルプライマーを用いて行った (Tamura & Hatano, 2001)。系統解析は MEGA version 4 (Tamura *et al.*, 2007), PHYLIP 3.65 package (Felsenstein, 2005), ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) を用いた。系統樹の作成は neighbor-joining 法 (Saitou & Nei, 1987), maximum-parsimony 法 (Kluge & Farris, 1969), maximum likelihood 法 (Felsenstein, 1981) を用い, ブートストラップ法 (Felsenstein, 1985) を用いてその検定を行った。

生理・生化学試験 各菌株および比較となる近縁の基準株を用い, 以下の試験項目について比較を行った。至適生育 pH, 至適生育温度, グラム染色性, 発酵能試験, 糖質化能試験, 酵素反応試験, 抗生物質耐性試験, 運動性の観察は定法に従って行った。走査型電子顕微鏡による形態観察 (Urai *et al.*, 2008), 金属イオン耐性試験と不溶性リン酸可溶性試験 (Kimoto *et al.*, 2010) も合わせて行った。また, 窒素固定活性はアセチレン還元試験で判定し, エチレンの定量はガスクロマトグラフ (GC-2014, SHIMADZU), キャピラリーカラム HP-PLOTQ (Agilent) を用いた。

化学分類学的試験 各菌株および比較となる近縁の基準株を用い, 以下の試験項目について比較を行った。キノン組成; キノン抽出は田村らの方法 (Tamura *et al.*, 1994) に従い

検出は ACUITY UPLC™ (UPLC/MS/MS, Waters) を用いた (Aizawa *et al.*, 2010c)。脂肪酸組成; 脂肪酸メチルエステルの抽出は田村らの方法 (Tamura *et al.*, 1994) に従い, 分析には GCMS (QP5050, SHIMADZU), カラムは SPB1 30m (SUPELCO) を使用した。染色体 DNA 抽出; 細胞からの DNA の抽出は定法に従って行い, 分光光度計を用いて波長 260 nm と 280 nm の吸光度を測定し, 得られた測定値の比から DNA の純度を検定した。その後, DNA 濃度の測定を Qubit fluorometer (Invitrogen) を用いて行った。この DNA 溶液を GC 含量測定および DNA-DNA 相同性試験に用いた。GC 含量測定; GC 含量の測定は HPLC (LC-10, SIMADZU) を用い, カラムは (Cosmosil 5C18-AR, 150 mm×4.6 mm) を用い, 移動相に 0.2M リン酸二水素アンモニウム-アセトニトリル (40:1) を用いて分析した。DNA-DNA 相同性試験; DNA-DNA 相同性試験はフォトビオチンを用いたマイクロプレート法 (Ezaki *et al.*, 1988, 1989; Tamura *et al.*, 1994) で行った。

結果と考察

ASS 適応植物表面に存在する新規 *Burkholderia* 属細菌について 本研究の前段階で酸耐性微生物として選抜された *Burkholderia* 属細菌はそれぞれ 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統解析の結果, 3つの手法で系統樹を作成しても全て独立したクラスターを形成し, SA41, SA42, SA53 と SA33, 7A078 および E25, E21 という 3つの異なる種である可能性が示された (Fig. 1)。本研究で提案した新種 3種と Fig. 1 で示した系統的に近縁な *Burkholderia* 属細菌の基準株との生理・生化学試験の結果を Table 1 および Table 2 に示す。ただし, *Burkholderia oxyphila* (Otsuka *et al.*, 2011) については我々の論文発表時に未報告であったため, 比較試験の対象とはしていない (Fig. 1, Tables 1, 2)。

本研究で提案した新種 3種および Table 1 と Table 2 に示した近縁種は *B. unamae*, *B. silvatlantica* (トウモロコシ根圏; Caballero-Mellado *et al.*, 2004; Perin *et al.*, 2006), *B. tropica* (サトウキビの茎; Reis *et al.*, 2004), *B. sacchari* (サトウキビ畑の土壌; Brämer *et al.*, 2001), *B. nodosa*, *B. mimosarum*, *B. tuberum* (マメ科植物の根粒; Chen *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2006; Vandamme *et al.*, 2002), *B. kururiensis* (トリクロロエチレンに汚染された帯水層; Zhang *et al.*, 2000; 基準株以外はマメ科根粒, トウモロコシから単離されている) など *B. ferrariae* (鉄鉱石; Valverde *et al.*, 2006) を除きほとんどが植物に関係する箇所から単離されてお

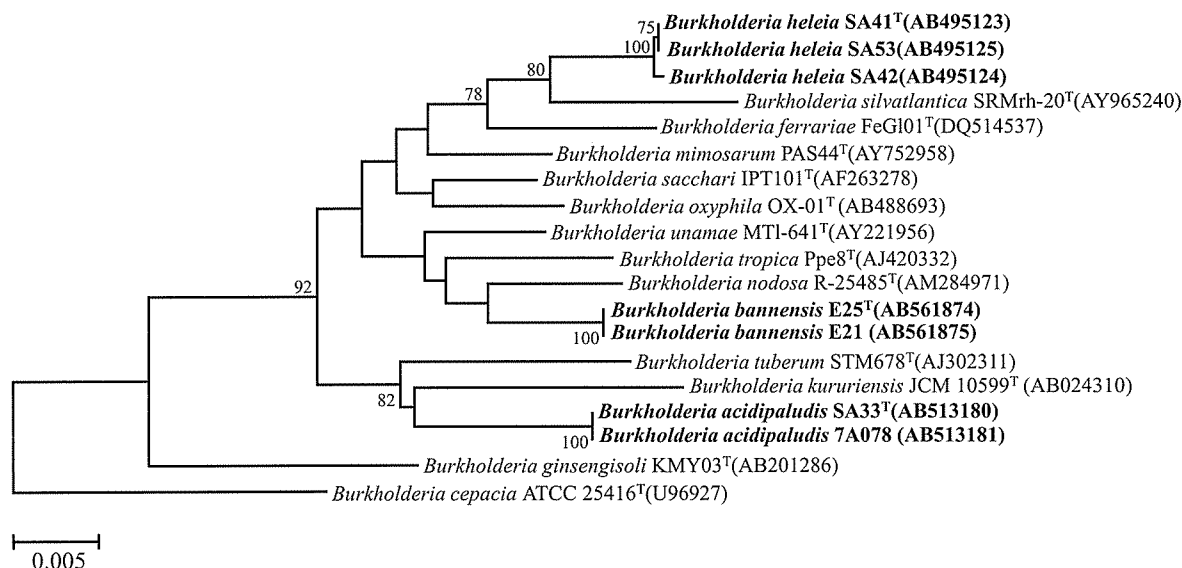


Fig. 1 Neighbor-joining tree based on nearly complete 16S rRNA gene sequences (positions 150 - 1418 of *Escherichia coli* 16S rRNA gene), showing the positions of strains SA41^T, SA42, SA53, SA33^T, 7A078, E25^T, and E21 among its phylogenetic neighbors. Numbers at branch nodes are values based on 1000 resamplings; only values over 70% are given. The sequence of *Burkholderia cepacia* ATCC 25416^T and *Burkholderia ginsengisoli* KMY03^T were used as the outgroups. Bar = 0.005 nucleotide substitutions per nucleotide position.

り, *B. oxyphila* (酸性森林土壌由来)を含め, 植物病原性を示す菌株も報告されていないことから, このクラスターに属する *Burkholderia* 属細菌は植物と共生して環境中に適応していると考えられ, 興味深い。以下に, 本研究で提案した新種 3 種の特徴, および種の記載を示す (Aizawa *et al.*, 2010a, 2010b, 2011)。

新規酸耐性窒素固定菌: *Burkholderia heleia* ベトナムの ASS の湿地 (pH 2-4) に生息するシログアイ (*Eleocharis dulcis*) の水中茎表面より単離した SA41, SA42, SA53 株は, 1/10 TS 液体培地 (pH 3.5) で生育させると, 培地 pH を上昇させ, かつ無窒素半流動性培地でアセチレン還元試験を行った結果, pH3.5 という強酸性でも窒素固定活性を示した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列の blast 解析の結果, これら 3 株は *Burkholderia* 属であることが示唆された。SA41 株とその他単離株, 近縁種との 16S rRNA 遺伝子の類似度は, SA42 株 (99.9%), SA53 株 (99.8%), *B. silvatlantica* (98.5%), *B. mimosarum* (98.2%), *B. ferrariae* (98.0%), *B. tropica* (97.0%) であった。SA41 株とその他単離株, 近縁種の基準株との DNA-DNA 相同性は SA42 株 (94%), SA53 株 (89%), *B. silvatlantica* (39%), *B. mimosarum* (41%), *B. ferrariae* (39%), および *B. tropica* (33%) であり, その他の生理・生化学試験および化学分類学的試験

(Tables 1, 2) を総合して, SA41, SA42, SA53 株を新種 *Burkholderia heleia* として提案した (Aizawa *et al.*, 2010a)。以下にその記載を示す。

Description of *Burkholderia heleia*

heleia (he.lei'a. Gr. *heleios*, a marsh, low ground, meadow; N.L. fem. adj. *heleia*, of the marsh, growing or dwelling in the marsh).

The cells are Gram-negative, strictly aerobic, non-spore-forming, non-motile rods (0.6 - 0.7 μm by 1.5 - 1.7 μm). Colonies are smooth, round, convex, and pale yellow with entire margins after 3 days' cultivation at 32°C on 1/10 tryptic soy agar plates (pH 4.0). Growth occurs between 17 and 42°C with an optimum at 32°C. The pH range for growth is 3.5 - 9.0, with optimum growth at pH 5.0. The bacteria grow on MacConkey agar at 29°C, but not at 37°C. Growth and acetylene reduction to ethylene occurs on nitrogen-free soft gel medium. The physiological characteristics are summarized in Table 1. The major isoprenoid quinone is Q-8, as described for the genus. The predominant cellular fatty acids are C_{16:0}, C_{17:0} cyclo, C_{18:1} ω7c, and summed feature 3 (C_{16:1} ω7c and/or iso C_{15:0} 2-OH). The DNA G+C contents of these strains are 64 mol%.

The type strain, SA41^T (= NBRC 101817^T = VTCC-

Table 1 Physiological characteristics of *B. heileia*, *B. acidipaludis*, *B. bannensis* and closely related type strains of *Burkholderia* species.

Characteristic	<i>B. heileia</i>	<i>B. acidipaludis</i>	<i>B. bannensis</i>	<i>B. umamae</i>	<i>B. tropica</i>	<i>B. sacchari</i>	<i>B. nodosa</i>	<i>B. mimosarum</i>	<i>B. kururuiensis</i>	<i>B. nuberum</i>	<i>B. silvaticola</i>	<i>B. ferrariae</i>
	SA41 ^T	SA33 ^T	E25 ^T	CIP 107921 ^T	LMG 22274 ^T	LMG 19450 ^T	LMG 23741 ^T	LMG 23256 ^T	JCM 10599 ^T	LMG 21444 ^T	LMG 23149 ^T	LMG 23612 ^T
Source	aquatic stem (<i>Eleocharis dulcis</i>)	aquatic stem (<i>Eleocharis dulcis</i>)	root (<i>Panicum repens</i>)	rhizosphere (maize)	stem (sugarcane)	soil (sugarcane plantation)	nodules (<i>Mimosar scabrella</i>)	nodules (<i>Mimosar</i> sp.)	aquifer (polluted with TCE)	nodules (<i>Aspalathus</i> <i>carnea</i>)	rhizosphere (maize)	iron ore
acidic pH-neutralization	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
AlCl ₃ tolerance (mM)	>1	5	1	5	5	>1	>1	1	>1	>1	1	>1
<i>nif</i> H PCR assay	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-
C ₂ H ₂ reduction [#] at pH3.5	26.5±2	-	-	8.8±3	17.1±4	-	8.3±3	12.3±4	21.7±3	26.5±4	22.4±5	-
C ₂ H ₂ reduction [#] at pH6.2	42.4±2	-	-	13.8±5	16.4±4	-	17.6±7	21.7±8	39.4±3	37.3±6	23.3±4	-
Activity of :												
Esterase (C4)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Esterase lipase (C8)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Valine arylamidase	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
Cystine arylamidase	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
β-Galactosidase	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
β-Glucosidase	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
Arginine dihydrolase	-	+	-	-	-	±	-	-	+	+	+	+
Urease	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Acid production from: [§]												
Erythritol	+	-	±	±	-	-	±	-	-	-	+	-
L-Xylose	+	+	±	+	±	-	+	-	+	+	-	±
D-Adonitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnose	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Amygdalin	-	-	±	±	-	-	±	-	-	-	-	-
Arbutin	+	+	+	±	±	-	±	±	-	-	-	±
Esculin	+	+	±	±	±	-	±	±	-	-	±	±
Salicin	+	+	±	±	±	-	±	±	-	-	±	±
D-Cellobiose	+	+	+	±	±	±	±	±	-	-	±	±
D-Maltose	+	+	+	±	±	-	±	±	-	-	±	±
D-Lactose	+	+	+	±	±	-	±	±	-	-	±	±
D-Sucrose	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
D-Trehalose	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
D-Raffinose	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
Gentiobiose	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
D-Tagatose	±	+	±	±	-	-	±	-	-	-	+	±
Utilization of: [‡]												
Glycerol	±	-	-	-	±	±	+	+	-	-	±	±
Adonitol	+	+	+	±	±	±	+	+	+	+	±	±
Gentiobiose	+	-	-	-	±	±	+	+	-	-	±	±
α-D-Lactose	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	±
Lactulose	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	±
D-Melibiose	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	±
D- Psicose	±	+	-	±	±	±	+	±	-	-	±	±
D-Raffinose	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	±

Table 1 continued 1.

Characteristic	<i>B. helica</i> SA41†	<i>B. acidiphilidis</i> SA33‡	<i>B. hannensis</i> E25†	<i>B. unamae</i> CIP 107921†	<i>B. trojice</i> LMG 22274†	<i>B. sacchari</i> LMG 19450†	<i>B. nodosa</i> LMG 23741†	<i>B. mimosarum</i> LMG 23256†	<i>B. karurtenis</i> JCM 10599†	<i>B. tubernum</i> LMG 21444†	<i>B. silvaticola</i> LMG 23149†	<i>B. ferrariae</i> LMG 23612†
L-Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
D-Trehalose	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
Xylitol	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	±
cis-Aconitic acid	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citric acid	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D-Galacturonic acid	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D-Glucuronic acid	-	-	+	±	-	+	-	+	+	+	+	+
α-Hydroxybutyric acid	±	-	-	±	±	+	+	+	-	+	+	+
Itaconic acid	-	-	-	+	±	+	+	+	-	+	+	-
α-Keto butyric acid	±	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
α-Keto glutaric acid	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Saccharic acid	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	±	+
Succinamic acid	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucuronamide	-	-	±	±	+	±	+	+	+	+	+	+
D-Alanine	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Alanyl-glycine	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycyl-L-glutamic acid	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Serine	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D,L-Carnitine	-	+	+	-	±	-	-	-	+	+	-	-
Thymidine	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Putrescine	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Aminoethanol	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2,3-Butanediol	-	-	-	±	±	-	-	-	+	+	-	-
D,L-α-Glycerol phosphate	±	-	+	±	±	-	-	-	+	+	-	+
α-D-Glucose-1-phosphate	-	-	+	±	±	+	+	-	-	-	+	-
D-Glucose-6-phosphate	+	-	+	±	±	+	+	-	-	-	+	+
Resistance to:† (µg ml ⁻¹)												
Amoxicillin (4)	+	+	+	+	±	+	+	+	-	-	+	+
Amoxicillin/clavulanic acid (4/2)	+	+	+	+	±	+	+	+	-	-	+	+
Streptomycin (8)	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	±	±
Kanamycin (8)	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	±	±
Gentamicin (4)	-	-	-	±	-	±	±	-	-	-	±	±
Apramycin (16)	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	±	±
Erythromycin (1)	+	+	+	+	-	+	+	+	±	±	+	+
Tylosin (2)	+	+	+	+	-	+	+	+	±	±	+	+
Colistin (4)	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Corrimoxazole (2/38)	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+
Flumequin (4)	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	±	±
Oxolinic acid (2)	+	-	-	-	-	+	±	-	-	-	±	±
Enrofloxacin (0.5)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rifampicin (4)	+	+	-	±	-	+	+	+	-	-	+	+

C₂H₅ reduction experiment (mmoles C₂H₅/h) using Winogradsky's nitrogen-free mineral soft gel medium containing 1% mannitol.
 * Results obtained by use of the API ZYM and API 20 NE systems.
 § Results obtained by use of the API 50CH system.
 ‡ Results obtained by use of the Biolog GN2 Microplate system.
 † Results obtained by use of the ATB VET system.

Table 2 Fatty acid compositions of *B. heilea*, *B. acidipaludis*, *B. bannensis* and closely related type strains of *Burkholderia* species.

Fatty acids	<i>B. heilea</i> SA41 ^T	<i>B. acidipaludis</i> SA33 ^T	<i>B. bannensis</i> E25 ^T	<i>B. inaniae</i> CIP 107921 ^T	<i>B. iropica</i> LMG 22274 ^T	<i>B. sacchari</i> LMG 19450 ^T	<i>B. nodosa</i> LMG 23741 ^T	<i>B. minosarum</i> LMG 23256 ^T	<i>B. kururiensis</i> JCM 10599 ^T	<i>B. tuberum</i> LMG 21444 ^T	<i>B. sihvallantica</i> LMG 23149 ^T	<i>B. ferrariae</i> LMG 23612 ^T
summed feature 2*	0.8	1.0	0.6	1.5	1.3	0.7	1.3	1.6	1.6	1.3	1.1	1.7
C _{14:0}	9.2	5.4	5.6	5.6	7.1	2.8	5.1	4.8	5.5	4.4	5.4	5.7
summed feature 3 [§]	12.9	6.1	8.6	16.7	2.5	3.8	14.5	10.2	15.0	16.0	8.8	9.7
C _{16:0}	41.7	39.8	44.3	23.8	45.6	31.1	32.8	29.6	29.0	26.0	38.7	28.7
C _{17:0} cyclo	16.0	19.8	14.6	14.9	18.3	25.9	15.0	17.1	7.1	11.4	19.6	16.0
C _{18:1} ω7c	17.8	21.0	18.4	30.9	8.9	31.1	27.1	31.4	36.7	35.8	17.5	30.6
C _{18:0}	ND	1.2	1.1	0.9	2.1	0.9	0.7	0.9	0.9	1.1	0.7	1.7
C _{19:0} cyclo ω8c	1.6	5.7	6.7	5.7	14.3	3.7	3.4	4.5	4.2	4.1	8.1	5.9

The analyses for the above mentioned strains were performed at least in triplicate using the cells grown under the same condition. ND, not detected.

*summed feature 2 corresponds to C_{14:0} 3-OH, iso C_{16:1} I, an unknown fatty acid with an equivalent chain-length of 10.947 or C_{12:0} ALDE or any combinations of these fatty acids.

§summed feature 3 corresponds to C_{16:1} ω7c and/or iso C_{15:0} 2-OH.

D6-7[¶]), was isolated in 2005, from an aquatic plant, *Eleocharis dulcis*, that grows luxuriantly in a highly acidic swamp (pH 3) in an actual acid sulfate soil area in Vietnam.

新規酸耐性・アルミニウム耐性：*Burkholderia acidipaludis* ベトナムの ASS の湿地 (pH 2-4) に生息するシログアイ (*Eleocharis dulcis*) の水中茎表面より単離した SA33 株および、タイの ASS の湿地 (pH 2-4) に生息するシログアイの根の組織内部より単離した 7A078 株は、1/10 TS 液体培地 (pH 3.5) で生育させると、培地 pH を上昇させ、かつ MT 培地 (pH 3.5) に塩化アルミニウムを加えた生育試験の結果、ASS に存在する平均的なアルミニウム濃度 (2-3 mM) を超える 5 mM に耐性を示した。16S rRNA 遺伝子の塩基配列の blast 解析の結果、これら 2 株は *Burkholderia* 属であることが示唆された。SA33 株と 7A078 株、近縁種との 16S rRNA 遺伝子の類似度は、7A078 株 (100%), *B. kururiensis* (97.3%), *B. sacchari* (97.1%), *B. tubernum* (97.0%) であった。SA33 株と 7A078 株、近縁種の基準株との DNA-DNA 相同性は 7A078 株 (90%), *B. kururiensis* (47%), *B. sacchari* (46%), *B. tubernum* (45%) であり、その他の生理・生化学試験および化学分類学的試験 (Tables 1, 2) を総合して、SA33 株と 7A078 株を新種 *Burkholderia acidipaludis* として提案した (Aizawa *et al.*, 2010b)。以下にその記載を示す。

Description of *Burkholderia acidipaludis*

acidipaludis (aci.di.pa.lu'dis. N.L. adj. *acidus* -a -um (from L. n. *acidum*) acid; L. gen. n. *paludis* of a swamp; N.L. gen. n. *acidipaludis* of an acidic swamp).

The cells are Gram-negative, strictly aerobic, non-spore-forming, non-motile rods (0.6 - 0.7 μm by 1.3 - 1.7 μm). Colonies are smooth, round, convex, and pale yellow with entire margins after 3 days' cultivation at 32°C on 1/10 tryptic soy agar plates (pH 4.0). Growth occurs between 17 and 37°C with an optimum range from 28 to 32°C. The pH range for growth is 3-8, with an optimum range of 4-7. The physiological characteristics are summarized in Table 1. The major isoprenoid quinone is Q-8, as described for the genus. The predominant cellular fatty acids are C_{16:0}, C_{18:1} ω7c, and C_{17:0} cyclo. The DNA G+C content is 64 mol%.

The type strain, SA33^T (= NBRC 101816^T = VTCC-D6-6^T), was isolated in 2005, from an aquatic plant, *Eleocharis dulcis*, that grows luxuriantly in a highly

acidic swamp (pH 3) in an actual acid sulfate soil area in Vietnam.

新規酸耐性菌：*Burkholderia bannensis* タイのASSの湿地 (pH 2-4) に生息するシログアイ (*Eleocharis dulcis*) の水中茎表面より単離した E25 株および根より単離した E21 株は、1/10 TS 液体培地 (pH 3.5) で生育させると培地 pH を上昇させた。16S rRNA 遺伝子の塩基配列の blast 解析の結果、これら 2 株は *Burkholderia* 属であることが示唆された。E25 株と E21 株、近縁種との 16S rRNA 遺伝子の類似度は、E21 株 (100%)、*B. unamae* (98.7%)、*B. tropica* (98.6%)、*B. sacchari* (97.6%)、*B. nodosa* (97.4%)、*B. mimosarum* (97.3%) であった。E25 株と E21 株、近縁種の基準株との DNA-DNA 相同性は E21 株 (90%)、*B. unamae* (42%)、*B. tropica* (42%)、*B. sacchari* (42%)、*B. nodosa* (45%)、*B. mimosarum* (35%) であり、その他の生理・生化学試験および化学分類学的試験 (Tables 1, 2) を総合して、E25 株と E21 株を新種 *Burkholderia acidipaludis* として提案した (Aizawa *et al.*, 2011)。以下にその記載を示す。

Description of *Burkholderia bannensis*

bannensis (ban.nen'sis. N.L. adj. *bannensis*, pertaining to the Banna region of Nakhon Nayok Province, Thailand).

The cells are Gram-negative, strictly aerobic, non-spore-forming, non-motile rods (0.6 - 0.8 μ m by 1.6 - 2.1 μ m). Colonies are smooth, round, convex, and pale yellow with entire margins after 3 days' cultivation at 32°C on 1/10 tryptic soy agar plates (pH 4.0). Growth occurs between 17 and 37°C with an optimum range from 28 to 32°C. The pH range for growth is 3-8, with an optimum range of 4-6. The physiological characteristics are summarized in Table 1. The major isoprenoid quinone is Q-8, as described for the genus. The predominant cellular fatty acids are C_{16:0}, C_{18:1} ω 7c, and C_{17:0} cyclo. The DNA G+C content is 65 mol%.

The type strain is E25^T (= NBRC 103871^T = BCC 36998^T), and was isolated in 2005, from a root of *Panicum repens*, an aquatic plant that grows luxuriantly in a highly acidic swamp (pH 3) in an actual acid sulfate soil area in Thailand.

アルミニウム耐性・重金属耐性・リン酸可溶化菌：*Acidocella aluminidurans* アルミニウムはこれまで比較的毒性の低い物質として食器や医薬品にも

広く利用されてきたが、前述のように酸性環境下ではイオン化し、細胞膜、細胞壁、DNA など生物物質へ結合することで、植物だけでなく動物へも毒性を示す。これまでの研究により植物のアルミニウム耐性の機作として、有機酸によるキレートなどが報告されている (Ma *et al.*, 2007)。一般的に、イネなど作物植物へのアルミニウム毒性は μ M のレベルで起こるが、ベトナムおよびタイの ASS では水中のアルミニウム濃度が 6 mM 以上を示す箇所もあった。そのため、酸感受性植物を ASS で生育させる場合、水中のアルミニウムイオンをある程度吸着、除去する陽イオン吸着能をもつ微生物、または資材の適用も効果的であると考えられる。

ASS に優占して生息するハイキビやシログアイの表面には非常に強いアルミニウム耐性菌やアルミニウムイオンを吸着、除去するバイオフィーム構成菌が棲息し、植物を保護している可能性がある。そこで、ベトナムの ASS の湿地 (pH3) に生息するハイキビ (*Panicum repens*) の水中茎表面よりアルミニウム耐性を指標に選抜した。選抜した菌株はすべて *Acidocella* 属に属しており、これらの菌株は、これまでの報告を大きく上回る濃度の塩化アルミニウム (150 mM) や硫酸マンガ (1 M)、硫酸ニッケル (20 mM)、硫酸カドミウム (1 mM)、塩化鉄 (0.4 mM)、硫酸銅 (0.1 mM) を含む酸性培地 (pH3) で良好な生育を示した。また、これらの菌株の外膜多糖 (LPS) は水溶液中のアルミニウムイオンを吸着し、リン酸アルミニウムやリン酸鉄などの不溶性リン酸塩の可溶性も示した。AL46 株と近縁種との 16S rRNA 遺伝子の類似度は、*A. facilis* (99.4%)、*A. aminolytica* (97.8%) であった。これら株との DNA-DNA 相同性は *A. facilis* (40.3%)、*A. aminolytica* (39.6%) であり (Fig. 2)、その他の生理・生化学試験およ

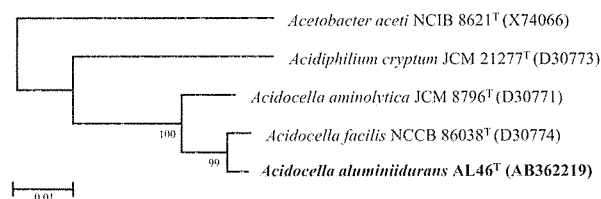


Fig. 2 Neighbour-joining tree, based on nearly complete 16S rRNA gene sequences (positions 19-1487 of the *Escherichia coli* 16S rRNA gene), showing the position of strain AL46^T among the phylogenetic neighbours. Numbers at branch nodes are percent values based on 1000 bootstrap resamplings; only values over 50 are given. The 16S rRNA gene sequence of *Acetobacter acetii* NCIB8621^T (X74066) was used as an outgroup. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

ベトナムおよびタイの酸性硫酸塩土壌地帯に生育する植物から単離した新規植物共生微生物の系統分類学的研究

Table 3 Physiological characteristics of *A. aluminidurans* and closely related type strains of *Acidocella* species.

Characteristic	<i>A. aluminidurans</i>	<i>A. facilis</i>	<i>A. aminolytica</i>
	AL46 ^T	NCCB 86038 ^T	JCM 8796 ^T
Acid production from: [§]			
Glycerol	-	-	+
Erythritol	-	+	-
L-Arabinose	-	+	-
D-Ribose	-	(+)	-
D-Adonitol	-	+	-
Methyl β-D-xylopyranoside	+	-	-
D-Galactose	-	+	-
D-Glucose	-	+	+
D-Mannose	-	+	-
L-Sorbose	-	(+)	+
L-Rhamnose	-	+	+
Dulcitol	-	+	-
Inositol	-	+	+
D-Mannitol	-	+	+
D-Sorbitol	(+)	(+)	-
Methyl α-D-mannopyranoside	-	+	+
Methyl α-D-glucopyranoside	-	-	+
Arbutin	-	+	-
D-Sucrose	-	-	(+)
D-Raffinose	-	+	-
Starch	-	+	+
Glycogen	-	+	+
Gentiobiose	+	-	-
D-Turanose	+	-	+
D-Lyxose	-	-	+
D-Fucose	-	-	+
L-Fucose	-	-	+
D-Arabitol	+	-	+
L-Arabitol	-	(+)	+
Potassium gluconate	-	-	+
Potassium 2-ketogluconate	-	(+)	-
Activity of : [*]			
Arginine dihydrolase	(+)	-	-
Urease	-	+	+
Acetoin production	-	+	+
Gelatinase	+	-	-
Cystine arylamidase	-	(+)	(+)

Table 3 continued

Characteristic	A. aluminidurans	A. facilis	A. aminolytica
	AL46 ^T	NCCB 86038 ^T	JCM 8796 ^T
Utilization of: [‡]			
Dextrin	(+)	(+)	-
Glycogen	(+)	(+)	-
Tween 40	-	+	(+)
Tween 80	-	+	(+)
D-Fructose	-	+	+
D-Mannose	-	(+)	-
D- Psicose	-	+	(+)
Succinic acid mono methyl ester	+	-	+
α -Hydroxy butyric acid	-	+	-
<i>p</i> -Hydroxy phenyl acetic acid	-	+	-
α -Keto butyric acid	-	+	-
α -Keto glutaric acid	(+)	-	+
Succinic acid	(+)	-	+
Bromo succinic acid	+	-	+
Succinamic acid	+	-	+
D-Alanine	(+)	-	-
L-Glutamic acid	(+)	-	-
L-Histidine	-	+	-
L-Ornithine	-	+	-
Urocanic acid	+	+	-
Putrescine	-	(+)	-
2-Aminoethanol	-	-	(+)
Glycerol	-	+	-
Resistance to: [†] (mg ml ⁻¹)			
Amoxicillin	+	-	-
Cotrimoxazole	+	-	+
Sulfamethizole	+	-	+
Fatty acid compositions			
cyclopropyl C _{19:0}	49.1	39.6	52.3
C _{18:1}	25.4	35.8	22.6
C _{16:0}	12.2	13.2	11.2
C _{16:0} 2-OH	6.7	2.9	5.2
C _{14:0} 3-OH	4.3	5.8	6.1
C _{18:0}	2.2	2.0	1.8

* Results obtained by use of the API ZYM and API 20 NE systems.

§ Results obtained by use of the API 50CH system.

‡ Results obtained by use of the Biolog GN2 Microplate system.

† Results obtained by use of the ATB VET system.

び化学分類学的試験 (Table 3) を総合して, AL46 株を新種 *Acidocella aluminiidurans* として提案した (Kimoto *et al.*, 2010). 以下にその記載を示す.

Description of *Acidocella aluminiidurans*

(a.lu.mi.ni.i.du'rans. N.L. n. *aluminium* (from L. n. *alumen*, alum), aluminium; L. part. adj. *durans*, enduring, being insensible; N.L. part. adj. *aluminiidurans*, aluminium-tolerant.).

Gram negative, strictly aerobic, non-spore-forming, non-motile rods (0.3 μm by 1.2 - 1.6 μm). Colonies are smooth, round, convex, and white on 1/10 tryptic soy agar plate. Growth occurs between 17 and 42°C but not at 5 or 45°C. The pH range for growth is 3.0 - 7.0 with optimum growth at pH 4 - 5. Growth occurs on MT medium (pH 4.0) containing 500 mM aluminum sulfate or 200 mM aluminum chloride. The physiological characteristics are summarized in Table 2. The major quinone is Q-10, as described for the genus. The predominant cellular fatty acids are cyclopropyl C_{19:0} and C_{18:1}. The DNA G+C content of the type strain is 65.6 mol%. The type strain, AL46^T (= NBRC 104303^T = VTCC-D9-1^T), was isolated in 2005, from *Panicum repens* inhabiting an acidic swamp in actual acid sulfate soil areas in Vietnam.

要 約

急激な増加を続ける地球人口を支える食糧増産のために, 陸地面積の約 30% を占める耕作に適さない「問題土壌」の耕作地への転換が求められている. この問題土壌の約 30% は酸性硫酸塩土壌 (acid sulfate soil: ASS) を含む酸性土壌であり, 低 pH に加え, その強酸性で各種金属類が可溶化する金属過剰害, 土壌中のリン酸が金属塩と結合, 不溶化する低リン酸ストレスなどによる植物の生育阻害が問題となっている. なかでも pH 4.5 以下でイオン化するアルミニウムイオン (Al³⁺) が酸性土壌における植物の生育阻害要因の主たるものとして挙げられている. 報告者は ASS 適応植物と微生物群が形成する植物・微生物共生体に着目し, 上記ストレスに強い耐性を示し, ①酸性環境の中性化②過剰金属の不活化③リン酸の可溶化④窒素化合物の供給などの有用な機能を持つ微生物群を得ている. 予備的な実験では, これらを酸感受性のイネに接種したところ酸性環境で生育促進が見られたことから, この微生物群を用いた作物植物の ASS 適応化は有効と期待される.

本研究では, これら共生微生物を利用したイネ等の作

物増産を目指し, その基礎的知見を得るために, 新規分類群に属すると予想される微生物群の分類学的性状について検討を加えた. その結果, 酸耐性窒素固定菌の *Burkholderia helea*, 酸耐性・アルミニウム耐性菌の *Burkholderia acidipaludis*, 酸耐性菌の *Burkholderia bannensis*, そして高濃度アルミニウム・重金属耐性・リン酸可溶性菌 *Acidocella aluminiidurans* という微生物群を新種として提案, 承認された. 今後はこれら植物生育促進効果について詳細に研究を進め, 微生物を活用した ASS を含む酸性土壌の農地利用, 食糧増産につなげていきたいと考えている.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 相澤朋子, 木本健一郎, Nguyen, V. B., 佐々木恵彦, 鈴木健一郎, 中嶋睦安, 砂入道夫. (2008). 酸性硫酸塩土地帯に生息する植物より単離したアルミニウム耐性菌について. 日本微生物資源学会 第15回大会 (千葉).
- 2) 相澤朋子, 田口博規, Nguyen, V. B., 中嶋睦安, 砂入道夫. (2009). 酸性硫酸塩土地帯の湿地に自生する *Ludwigia adscendens* 表面から単離した新規 *Frateria* 属細菌について. 日本農芸化学会2009年度大会 (福岡).
- 3) 相澤朋子, 木本健一郎, 石原弘樹, Nguyen, V. B., Vijarnsorn, P., 佐々木恵彦, 中嶋睦安, 砂入道夫. (2009). 東南アジア酸性硫酸塩土地帯の強酸性湿地に自生する植物とその共生微生物. 日本農芸化学会2009年度大会 (福岡).
- 4) 相澤朋子, 田口博規, 木本健一郎, 姜東鎮, Vijarnsorn, P., Nguyen, V. B., 中嶋睦安, 砂入道夫. (2009). 酸性硫酸塩土地帯の植物より単離した耐酸性窒素固定菌について. 日本微生物資源学会 第16回大会 (大阪).
- 5) 齋藤史門, 相澤朋子, Nguyen, V. B., 中嶋睦安, 砂入道夫. (2010). 新規アルミニウム耐性菌 *Pullulanibacillus* 属細菌の解析と応用の検討. 日本農芸化学会2010年度大会 (東京).
- 6) 相澤朋子, 石原弘樹, 田口博規, 浅井俊彦, Nguyen, V. B., Vijarnsorn, P., 中嶋睦安, 砂入道夫. (2010). アルミニウム耐性菌との混合による窒素固定菌へのアルミニウム耐性付与. 日本農芸化学会2010年度大会 (東京).
- 7) 太田裕介, 相澤朋子, 木本健一郎, Nguyen, V. B., 中嶋睦安, 砂入道夫, 光澤浩. (2010). 高濃度 Al 耐性菌 *Acidocella aluminiidurans* のアンモニウムトランスポーターの機能解析. 日本農芸化学会2010年度大会 (東京).
- 8) 太田裕介, 相澤朋子, 木本健一郎, Nguyen, V. B., 中嶋睦安, 砂入道夫, 光澤浩. (2011). 高濃度 Al 耐性菌 *Acidocella aluminiidurans* の2つのアンモニウムトランスポーターの異なる機能. 日本農芸化学会2011年度大会 (京都).
- 9) 川合瑞希, 相澤朋子, 木本健一郎, 石原弘樹, 田口博規, Nguyen, V. B., Vijarnsorn, P., 砂入道夫. (2011). アルミニウム存在下における酸耐性窒素固定菌とアルミニウム耐性菌の混合培養時の動態. 日本農芸化学会2011年

度大会 (京都).

swamps in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 1645-1650.

ポスター発表

- 1) Aizawa, T., Kimoto, K., Nguyen, V. B., Vijarnsorn, P., Nakajima, M. & Sunairi, M. (2008). Characterization and application of symbiotic bacteria isolated from waterweeds adapted to actual acid sulfate soils. 12th International Symposium on Microbial Ecology. (Cairns, Australia)
- 2) Aizawa, T., Kimoto, K., Nguyen, V. B., Vijarnsorn, P., Nakajima, M. & Sunairi, M. (2008). Waterweeds adapted to actual acid sulfate soils (AASS) and their associated microorganisms. The 6th International Symposium on Southeast Asian Water Environment Program. (Bandung, Indonesia)
- 3) 齋藤史門, 相澤朋子, Nguyen, V. B., 中嶋睦安, 砂入道夫. (2009). 酸性硫酸塩土壌に自生する植物から単離した新規高濃度アルミニウム耐性菌. 日本微生物生態学会第25回大会 (広島).
- 4) 相澤朋子, 石原弘樹, 田口博規, 浅井俊彦, Nguyen, V. B., Vijarnsorn, P., 中嶋睦安, 砂入道夫. (2009). 酸性硫酸塩土壌に自生する窒素固定菌へのアルミニウム耐性付与. 日本微生物生態学会 第25回大会 (広島).
- 5) 相澤朋子, 木本健一郎, Nguyen, V. B., Vijarnsorn, P., 中嶋睦安, 砂入道夫. (2010). 酸性問題土壌に生育する植物-微生物共生系のゲノム科学的アプローチによる解析と応用. 微生物研究会 (東京).
- 6) Aizawa, T., Kimoto, K., Nguyen, V. B., Vijarnsorn, P., Nakajima, M. & Sunairi, M. (2010). Characterization and application of symbiotic nitrogen-fixing bacteria isolated from plants adapted to highly acidic soils. 1st Asian Conference on Plant-Microbe Symbiosis and Nitrogen Fixation (宮崎).

原著論文

- 1) Kimoto, K., Aizawa, T., Urai, M., Nguyen, V. B., Suzuki, K., Nakajima, M. & Sunairi, M. (2010). *Acidocella aluminidurans* sp. nov., an aluminum-tolerant bacterium isolated from *Panicum repens* grown in a highly acidic swamp in actual acid sulfate soil area of Vietnam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 674-678.
- 2) Aizawa, T., Nguyen, V. B., Nakajima, M. & Sunairi, M. (2010). *Burkholderia heleia* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from an aquatic plant, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 1152-1157.
- 3) Aizawa, T., Nguyen, V. B., Vijarnsorn, P., Nakajima, M. & Sunairi, M. (2010). *Burkholderia acidipaludis* sp. nov., aluminum-tolerant bacteria isolated from the Chinese water chestnut, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in Southeast Asia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 2036-2041.
- 4) Aizawa, T., Vijarnsorn, P., Nakajima, M. & Sunairi, M. (2011). *Burkholderia bannensis* sp. nov., an acidic pH-neutralizing bacterium isolated from torpedo grass (*Panicum repens*) that grows in highly acidic

保存機関に寄託した菌株

本研究を通じて分離・解析した以下の菌株を, NITE Biological Resource Center (NBRC), BIOTEC Culture Collection (BCC), および Vietnam Type Culture Collection (VTCC) へ寄託した.

Achromobacter xylosooxidans B53=NBRC 101814=VTCC D6-4

Acidocella aluminidurans Al 46^r=NBRC 104303^r=VTCC D9-1^r

Acidocella aminolytica Al 8=NBRC 103876=VTCC D9-2

Acidocella aminolytica Al 22=NBRC 103877=VTCC D9-3

Acidocella aminolytica Al 24=NBRC 103878=VTCC D9-4

Acidocella aminolytica Al 84=NBRC 103880=VTCC D9-5

Acidocella aminolytica Al 68=NBRC 103879=VTCC D9-6

Acidisphaera sp. C-75=NBRC 103870=BCC 36997

Acidisphaera sp. A-144=NBRC 104652=BCC 37004

Acidiphilium sp. 7E-03=NBRC 103875=BCC 37002

Burkholderia acidipaludis SA33^r=NBRC 101816^r=VTCC D6-6^r

Burkholderia acidipaludis 7A078=NBRC 103872=BCC 36999

Burkholderia bannensis E25^r=NBRC 103871^r=BCC 36998^r

Burkholderia heleia SA41^r=NBRC 101817^r=VTCC D6-7^r

Burkholderia heleia SA42=NBRC 101818=VTCC D6-8

Burkholderia heleia SA53=NBRC 101819=VTCC D6-9

Burkholderia sp. SA77=NBRC 101820=VTCC D6-10

Burkholderia sp. SA32=NBRC 101815=VTCC D6-5

Burkholderia sp. 7A087=NBRC 103873=BCC 37000

Burkholderia gladioli 7D-4=NBRC 103874=BCC 37001

Burkholderia tropica B8=NBRC 101812=VTCC D6-2

Burkholderia tropica B20=NBRC 101813=VTCC D6-3

Enterobacter sp. M1F2=NBRC 103865=BCC 36992

Enterobacter sp. M2B3=NBRC 103866=BCC 36993

Enterobacter sp. M2E6=NBRC 103867=BCC 36994

Enterobacter sp. EG84=NBRC 104299=BCC 37003

Frateuria sp. M28=NBRC 104300=VTCC D9-7

Frateuria sp. Bio32=NBRC 104301=VTCC D9-12

Klebsiella pneumoniae RM4=NBRC 103868=BCC 36995

Pantoea sp. EG78=NBRC 103869=BCC 36996

Pantoea sp. B5=NBRC 101811=VTCC D6-1

Pullulanibacillus sp. CA42=NBRC 104302=VTCC D9-8

謝 辞

本研究の遂行にあたり、3年間研究助成していただいた公益財団法人発酵研究所に厚く御礼申し上げます。また、本研究の一部は文部科学省21世紀COEプログラムの一環として行われた日本、ベトナム社会主義共和国およびタイ王国を始めとした研究グループとの共同研究であり、Can tho大学のNguyen Bao Ve教授、Kien Gian農業普及所Do Minh Nhut所長、Banna Experimental StationのPisoot Vijarnsorn所長に心から深謝いたします。また、菌株の寄託にあたり、NITEの鈴木健一郎部門長、中川恭好博士、田村朋彦博士、宮道慎二博士に心から深謝いたします。

また、終始適切なご指導、ご鞭撻を賜りました日本大学生物資源科学部の佐々木恵彦教授、石井龍一教授、長谷川功教授、隅田裕明准教授、内山寛准教授、磯部勝孝准教授、姜東鎮博士および分子微生物学研究室の中嶋陸安教授、砂入道夫准教授、浦井誠博士に心から深謝いたします。なお、本研究は大学院生であった木本健一郎博士（日本大学）の学位論文の研究の一部として行われたものを含んでいます。実験を行うにあたり、ご協力を頂きました分子微生物学研究室の皆さんに心より厚く御礼申し上げます。最後に、本研究の多くは日本大学生物資源科学部生命科学センターを用いて行われたものであり、別府輝彦教授、上田賢志准教授に心から感謝いたします。

文 献

- 相澤 朋子 (2008). バイオフィルムの基礎と制御, p. 341-349, エヌ・ティー・エス, 東京.
- Aizawa, T., Nguyen, B. V., Kimoto, K., Iwabuchi, N., Sumida, H., Hasegawa, I., Sasaki, S., Tamura, T., Kudo, T., Suzuki, K., Nakajima, M., & Sunairi, M. (2007). *Curtobacterium ammoniigenes* sp. nov., an ammonia-producing bacterium isolated from plants inhabiting acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1447-1452.
- Aizawa, T., Nguyen, B. V., Nakajima, M. & Sunairi, M. (2010a). *Burkholderia heleia* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from an aquatic plant, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in actual acid sulfate soil areas of Vietnam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 1152-1157.
- Aizawa, T., Nguyen, B. V., Vijarnsorn, P., Nakajima, M. & Sunairi, M. (2010b). *Burkholderia acidipaludis* sp. nov., aluminum-tolerant bacteria isolated from the Chinese water chestnut, *Eleocharis dulcis*, that grows in highly acidic swamps in Southeast Asia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 2036-2041.
- Aizawa, T., Nguyen, B. V., Vijarnsorn, P., Kimoto, K., Sasaki, S., Nakajima, M. & Sunairi, M. (2008). Application of symbiotic bacteria isolated from plants adapted to actual acid sulfate soil. In S. Sasaki *et al.* (eds.). *Development of New Bioremediation Systems of Acid Sulfate Soil for Agriculture and Forestry* p. 57-62. Nakanishi Printing, Sapporo.
- Aizawa, T., Urai, M., Iwabuchi, N., Nakajima, M., & Sunairi. (2010c). *Bacillus trypoxylicola* sp. nov., xylanase-producing, alkaliphilic bacteria isolated from larval guts of the Japanese horned beetle (*Trypoxyllus dichotomus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 61-66.
- Aizawa, T., Vijarnsorn, P., Nakajima, M. & Sunairi, M. (2011). *Burkholderia bannensis* sp. nov., an acidic pH-neutralizing bacterium isolated from torpedo grass (*Panicum repens*) that grows in highly acidic swamps in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 1645-1650.
- Baligar, V.C. & Ahlrichs, J.L. (1998). Proceeding of the Workshop to Develop a Strategy for Collaborative Research and Dissemination of Technology in Sustainable Crop Production in Acid Savannas and other Problem Soils of the World, Purdue University. p.1-11.
- Brämer, C. O., Vandamme, P., da Silva, L. F., Gomez, J. G. C. & Steinbüchel, A. (2001). *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1709-1713.
- van Breemen, N. & Pons, L.J. (1978). Proceeding of the International Rice Research Conference (IRRC), Los Banos, Philippines, p.739-761.
- Caballero-Mellado, J., Martínez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G. & Estrada-de los Santos, P. (2004). *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1165-1172.
- Chen, W.-M., de Faria, S. M., James, E. K., Elliott, G. N., Lin, K.-Y., Chou, J.-H., Sheu, S.-Y., Cnockaert, M., Sprent, J. I. & Vandamme, P. (2007). *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1055-1059.
- Chen, W. M., James, E. K., Coenye, T., Chou, J. H., Barrios, E., de Faria, S. M., Elliott, G. N., Sheu, S. Y., Sprent, J. I. & Vandamme, P. (2006). *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1847-1851.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y., Takeuchi, N., Yamamoto, H., Liu, S. L., Miura, H., Matsui, K. & Yabuuchi, E. (1988). Simple genetic method to identify viridans group streptococci by colorimetric dot hybridization and fluorometric hybridization in microdilution wells. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 1708-1713.
- Ezaki, T., Hashimoto, Y. & Yabuuchi, E. (1989).

- Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 224-229.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**: 368-376.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Felsenstein, J. (2005). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.65., Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, USA.
- 後藤逸男 (2001). 土壌学概論. p.31-36, 朝倉書店, 東京.
- Hashidoko, Y., Tada, M., Osaki, M. & Tahara, S. (2002). Soft gel medium solidified with gellan gum for preliminary screening for root-associated, free-living nitrogen-fixing bacteria inhabiting the rhizosphere of plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 2259-2263.
- Kimoto, K., Aizawa, T., Urai, M., Nguyen, B. V., Suzuki, K.-I., N., Nakajima, M. & Sunairi, M. (2010). *Acidocella aluminiidurans* sp. nov., an aluminum-tolerant bacterium isolated from *Panicum repens* grown in a highly acidic swamp in actual acid sulfate soil area of Vietnam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 764-768.
- Kluge, A. G. & Farris, F. S. (1969). Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst. Zool.* **18**: 1-32.
- 久馬一剛 (1986). 東南アジアの低湿地. *アーバンクボク*. **25**: 2-7.
- Ma, J.F. (2007). Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **264**: 225-252.
- 松坂泰明, 栗原淳 & 天野洋司 (1994). 土壌・植物栄養・環境事典. 博友社, 東京.
- Otsuka, Y., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y., Matsuda, M., Nakamura, M., & Murata, H. (2011). *Burkholderia oxyphila* sp. nov., a bacterium isolated from acidic forest soil that catabolizes (+)-catechin and its putative aromatic derivatives. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 249-254.
- Perin, L., Martinez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., Baldani, J. I., Estrada-de los Santos, P., Reis, V. M. & Caballero-Mellado, J. (2006). *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1931-1937.
- Reis, V. M., Estrada-de los Santos, P., Tenorio-Salgado, S. & 10 other authors (2004). *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 2155-2162.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596-1599.
- Tamura, T. & Hatano, K. (2001). Phylogenetic analysis of the genus *Actinoplanes* and transfer of *Actinoplanes minutisporangius* Ruan *et al.*, 1986 and '*Actinoplanes aurantiacus*' to *Cryptosporangium minutisporangium* comb. nov. and *Cryptosporangium aurantiacum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 2119-2125.
- Tamura, T., Nakagaito, Y., Nishii, T., Hasegawa, T., Stackebrandt, E. & Yokota, A. (1994). A new genus of the order *Actinomycetales*, *Couchioplanes* gen. nov., with descriptions of *Couchioplanes caeruleus* (Horan and Brodsky, 1986) comb. nov. and *Couchioplanes caeruleus* subsp. *azureus* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 193-203.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4876-4882.
- Urai, M., Aizawa, T., Nakagawa, Y., Nakajima, M. & Sunairi, M. (2008). *Mucilaginibacter kameinonensis* sp. nov. isolated from garden soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 2046-2050.
- Valverde, A., Delvasto, P., Peix, A., Velázquez, E., Santa-Regina, I., Ballester, A., Rodríguez-Barrueco, C., García-Balboa, C. & Igual, J. M. (2006). *Burkholderia ferrariae* sp. nov., isolated from an iron ore in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 2421-2425.
- Vandamme, P., Goris, J., Chen, W. M., de Vos, P. & Willems, A. (2002). *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov. nodulate the roots of tropical legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**: 507-512.
- Zhang, H., Hanada, S., Shigematsu, T., Shibuya, K., Kamagata, Y., Kanagawa, T. & Kurane, R. (2000). *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 743-749.

マイナーポピュレーション解析を含めた口腔内細菌叢の 網羅的多様性解析ならびに分類学的検討

河村好章

愛知学院大学薬学部微生物学講座

〒464-8650 愛知県名古屋千種区楠元町 1-100

Global analysis and taxonomic investigation of the oral microbiota, including the minority populations

Yoshiaki Kawamura

Department of Microbiology Aichigakuin University, School of Pharmacy
1-100 Kusumoto-cho, Nagoya 464-8650, Japan

In recent years, analyses of the constitutive bacterial species of complex microbiota, such as those found in the oral cavity and intestinal tract, have been carried out using genetic-based approaches. To analyze a wide variety of bacterial species simultaneously, researchers commonly use PCR amplification using primers to the same conserved area of the 16S rRNA gene. However, with the use of this approach the DNA from numerically predominant bacteria is much more likely to be amplified, compared to DNA from bacteria that form a small proportion of the total population and that are therefore much less likely to be amplified due to target competition for available primers.

In this study we developed a new technique, which we call "DNA-deduction", where approximately 70% of the predominant bacterial DNA is removed in a single procedure before PCR amplification. Using this novel approach, we can detect a variety of the minority bacterial species of the mouth that have so far been overlooked. After applying this technique to oral specimens, we were able to detect several previously unobserved amplicons by DGGE that might be derived from minority bacteria. Following metagenome analysis of the specimens based on pyrosequence data, carried out in parallel to assess the performance of DNA-deduction, we concluded that approximately 18-30% of the microbes present were detected by the new technique. After analyzing the metagenome data at the phylum, genus, and species levels, we concluded that many kinds of microbes, including the minority bacteria, could be detected by our deduction method.

In summary, the development of "DNA deduction" greatly improves our ability to detect microbes from complex specimens containing dominant and minority community members, and as such we conclude that this deduction technique is extremely useful for analyzing complex microbiota.

Key words: oral microbiota, deduction, DGGE, pyrosequence, metagenome

緒 言

パスツール、コッホに始まる近代微生物学、とりわけ病原細菌学では、一種類の単離した「強毒」細菌について、その性状や薬剤感受性を測定し、それを以って疾病を制御することを目指してきた。口腔細菌学の分野においても齲蝕（いわゆる虫歯）の原因菌を突き止め、それ

を制御することにより、疾病をコントロールすることを目指した。一方で、多くの微生物は planktonic cell の状態で存在しているわけではなく、同じ菌種同士あるいは異なる菌種とともにコミュニティを作り生活していることも判ってきており、疾病の発生原因として、バイオフィルムやフローラ（細菌叢）などの微生物の集合体を網羅的に解析しコントロールする試みが行われている（Kolenbrander *et al.*, 2010）。

口腔内には700種以上の細菌が生息していると推定され、特有の生息場所を求めて、それぞれの部位で特

E-mail: kawamura@dpc.agu.ac.jp

有の細菌叢を形成している。口腔内では主として、頬粘膜面、舌背、歯面および歯肉溝（歯肉縁下）の4つの細菌叢が存在するとされている（Aas *et al.*, 2005）。また、口腔内細菌叢は年齢や食生活、衛生環境といった様々な要因によっても構成種が大きく異なってくる（Lenander-Lumikari & Loimaranta, 2000）。

これら口腔内細菌叢を構成している多種多様なメンバーを検出・解析するため、古くは培養による解析方法が試みられてきた。しかし多種類の培地を使い、また異なった培養条件（温度やガス分圧など）での培養が必要であり、非常に煩雑であった。さらには培養が困難な微生物が存在し、培養法ではその全容が解明できないことも明らかとなってきた（Faveri *et al.*, 2008）。これらの問題点を踏まえ、現在では培養に拠らない分子生物学的なアプローチが主流となっている（Sakamoto *et al.*, 2003）。

これまでに報告のある口腔内細菌の解析方法として菌種（属）特異PCR法、PCR-RFLP分析、T-RFLP分析、DGGE分析、checkerboard hybridization法、DNAマイクロアレイ法、FISH法、定量的PCR法やmetagenome解析などが挙げられる。しかし、どの方法にも一長一短があり、万能な方法は存在しないといえる（渡辺 2007; 河村 2010）。

現在までに最も多用されてきたのが、16S rRNAのPCR増幅とそのランダムクローニング法であろう。16S rRNA塩基配列情報は、細菌の分類・同定にも役立つ情報を与えてくれることから、非常に有望な方法とされてきた。しかしWangら（2003）の報告によれば、1検体から361クローンを解析しても細菌叢の82.6%をカバーしたに過ぎないとしている。通常の研究では1検体から数十～100クローン程度を解析するのが一般的であり、単純に計算すれば、存在している細菌叢の20～30%しか検出していない、ということにもなる。さらにPCRバイアス（偏り）がかかり、PCR増幅の段階でメジャーな菌種由来のDNAばかりが増幅してしまい、マイナーな菌種DNAは増幅されないことが明らかとなっている（河村ら, 1998）。

より最近の手法としてはpyrosequencingを用いたmetagenome解析が挙げられる（Maukonen *et al.*, 2008）。次世代シーケンサーを用いたmetagenome解析は、ハイスループット配列を用いた手法であり、100 bp～500 bp程度の比較的短いシーケンスを用いて分析を行う。現存している微生物細菌叢の分類同定において、細菌叢全体の多様性解析が可能な唯一のアプローチであるとされている（Wommack *et al.*, 2008）。

現在、これらの手法を組み合わせると口腔内細菌が分類されているが、すべての菌種が明らかにされているわけ

ではない。特に口腔内疾患と細菌の関係は未だ不明な点も多く、これまでの手法では見過ごされてきた、微量に存在するマイナー菌種の疾患への関与も否定できない。そのため口腔内細菌叢の解析において、多量に存在する菌種から少数しか存在していない菌種まで、網羅的に多くの菌種を検出できる手法の開発が望まれている。

そこで本研究では、サブトラクション技術を応用した新たな手法であるDNA deductionを用いて優勢菌種の除去を行い、DGGE分析やmetagenome解析を用いて微量菌種を含めた口腔内細菌叢の解析を試みた。

実験方法

サンプルDNAの回収とPCR増幅

健康人の起床直後の唾液を2 ml tubeに回収した。遠心（15,000 rpm, 4°C, 3 min）し、沈殿物をサンプルとして用いた。MORA-EXTRACT（AMR社）により、菌体を物理破碎し、DNAを抽出、精製した。Nanodrop（Thermo Fisher Scientific）により吸光度を測定し、抽出DNA濃度を求めた。

抽出DNAをtemplate DNAとし、Biotin化primersを使った16S rRNA遺伝子の増幅を行った。Forward primerとしてBiotin-8F（5'-Bio-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'）、Reverse primerとしてBiotin-519R（5'-Bio-GWATTACCGCGGKGCTG-3'）を使用し、EX-Taq（Takara）により増幅した。

反応条件はdenature 94°C 15sec, annealing 55°C 15sec, extension 72°C 30secを35cycle行い、final extension 72°C 7minで行った。PCR増幅産物は、エタノール沈殿法により回収し、NanodropによりDNA量の測定を行った。

PCR competition

Streptococcus mitis および *S. mutans* のDNAを使い、16S rRNA遺伝子の増幅を行った。PCR条件等は上述と同じである。但しprimersはbitoin付加していないものを使用した。鋳型DNAとして *S. mutans* は常に10 pgを使用し、そこに *S. mitis* のDNAを様々な割合で混合（10 pg～10 ng）しPCR増幅した。

PCR増幅産物は制限酵素 *Spe*-I で処理した。その後1%アガロースゲル電気泳動を行った。

DNA-deduction (Fig. 1)

(1) サンプルDNAの超音波処理 唾液よりMORA-EXTRACT法によって得られたDNA溶液400 μlを、Handy Sonic (Model UR-20P, TOMY)を用いて超音波処理し、およそ1 kbp以下の断片とした。処理後は

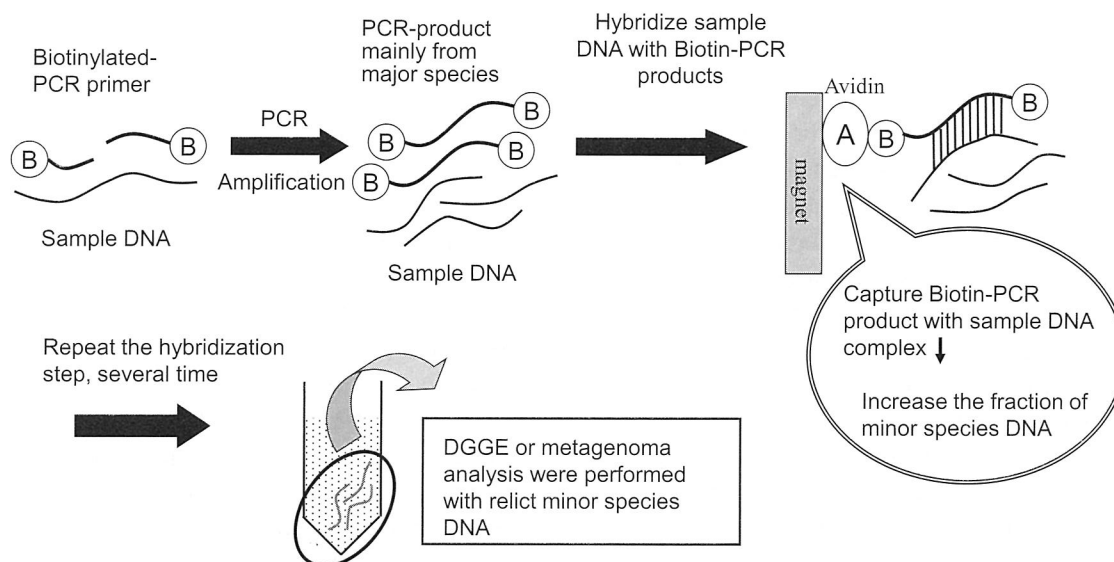


Fig. 1 Method of DNA deduction

ethachinmate (Nippongene) を加えてエタノール沈殿し、Nanodrop により DNA 量の測定を行った。

(2) **Hybridization** 超音波処理 DNA 0.5 μ g と Biotin-PCR 産物 15 μ g を 0.2 ml tube に取り、Centrifugal evaporator (CVE-2000, EYELA) を用いてドライアップした。2.5xEE buffer (25 mM EPPS, 2.5 mM EDTA, pH8.0) で溶解した後、heat denature し、4 $^{\circ}$ C に冷却した。4 μ l の 5M NaCl を加えたのち、55 $^{\circ}$ C に保持し hybridization を 6 hr 行った。

(3) **Avidine-Beads の洗浄** 0.5 mg の Streptavidin coated beads (Dyna-beads, Invitrogen) を 1.5 ml tube に取り、1 ml の 1 x EEN buffer (10mM EPPS, 1mM EDTA, 1M NaCl) を加え懸濁した。磁石スタンド (Magical Trapper, TOYOBO) に立て beads を吸着させた。上清を除去した後、再度 1 ml の 1 x EEN buffer を加え、ピペッティングで懸濁した後、磁石スタンドに立て beads を吸着、上清の除去を行い、beads の洗浄を行った。合計で 3 回 beads の洗浄を行った。

(4) **DNA deduction 操作** 洗浄済みの Dyna-beads の入った 1.5 ml tube に、hybridization 反応後の溶液を加え、混和させた。磁石スタンドに立て、beads を吸着させ、上清を 1.5 ml tube に回収した。再度 beads の入った tube に 200 μ l の 1 x EEN buffer を加えて懸濁し、磁石スタンドにて beads を吸着させ、回収した上清を先ほどの回収上清と混合した。Ethachinmate を加え、エタノール沈殿した。適量の 2.5xEE buffer に溶解した。

この溶液に対し、Biotin-PCR 産物 15 μ g を新たに加

え、heat denature 後、55 $^{\circ}$ C に保持し 2 度目の hybridization を行った。Hybridization は合計 3 回を行い、DNA を回収した。

DNA-deduction 効率の確認

Real time PCR 法にて deduction 効率の測定を行った。DNA-deduction 後のサンプルと、deduction せずに回収のみを行ったサンプルについて DNA 量の測定を行い、検量線と理論値から全体の DNA の残量を計算した。反応液は SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa) を使用し、プライマーは 16S-8F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') と 16S-342R (5'-CTGCTGCSYCCCGTAG-3') を最終濃度がそれぞれ 0.4 μ M となるようを用いた。検量線を得るため template DNA として超音波破碎後のサンプル DNA 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg を用いた。反応は 1st denature 95 $^{\circ}$ C 30sec の後、denature 95 $^{\circ}$ C 10sec, annealing 55 $^{\circ}$ C 15sec, 72 $^{\circ}$ C 30sec を 35cycle 行った。反応後 dissociation program を行い、melting curve を得た。

DGGE 分析

Bio-Rad の仕様書に従い、8% Gel 変性濃度勾配 20~60% のグラジェントゲルを作成した。DGGE マーカー用サンプルとして口腔内に一般的に存在し、G+C 含量が異なるために DGGE 分析によって異なる移動度を示す、以下の 5 菌種基準株 DNA を用いた。

Fusobacterium nucleatum subsp. *nucleatum* PAGU

1217^T (= JCM 8532^T)

Streptococcus mitis PAGU 567^T (= NCTC 12261^T)

Veillonella parvula PAGU 1210^T (= JCM 12972^T)

Rothia mucilaginosa PAGU 1047^T (= CCM 2417^T)

Actinomyces naeslundii PAGU 1209^T (= JCM 8349^T)

マーカー用サンプル DNA は 1 ng, deduction 前後のサンプルはそれぞれ 1 μl を template DNA として DGGE-PCR を行った. Forward primer は 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') に Bio Rad 社推奨の GC clump を結合させたもの, Reverse primer は 518R (5'-ATTA CCGCGGCTCTGG-3') を使用した. 反応条件は 1st denature 94°C 3 min の後, denature 94°C 15 sec, annealing 55°C 15 sec, extension 72°C 30 sec を 35 cycle 行い, final extension 72°C 7 min で行った.

DGGE 分析は D Code 微生物群集解析基本システム (Bio Rad) を用いて行った. 泳動槽温度 60°C, 100 V で 14 h 電気泳動を行った.

Metagenome 解析

Deduction 処理前のサンプルと処置後のものについて metagenome 解析を行った. Forward primer として 8F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), Reverse primer として 519R (5'-GWATTACCGCGG KGCTG-3') を使用し, 16S rRNA の 5' 末端側約 500 bp を PCR にて増幅した. Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) を用いて増幅産物を精製した. Roche 454 FLX-Titanium を使用した pyrosequence 反応は, 米国 Beckman Coulter Genomics 社に委託した. 得られたデータの基本解析は, Ginaris 社にて実施した. さらにかずさ DNA 研究所の平川博士に in-house blast 解析を行って頂いた.

なお, 本研究では, RDP database project (<http://rdp.cme.msu.edu/>) の reference シークエンスと 97% 以上の類似度があった場合に, 当該菌種名を同定名とした.

系統解析

上述の各種実験において得られた塩基配列データは, DNASIS-Pro (Hitachi solutions), DNASIS-Taxon (Hitachi solutions), Clustal-X (Thompson *et al.*, 1997) の各 software を用いて編集ならびに解析した. 系統樹は近隣接合法により作成し, Treeview (Page, 1996) および NjPlot (Perriere & Gouy, 1996) により描写した.

結果と考察

PCR competition の確認

制限酵素 *Spe*-1 により *S. mutans* 由来の PCR 産物のみが切断されていることをまず確認した. 一定量の *S. mutans* DNA に対し, 様々な割合で *S. mitis* DNA を混合し, PCR 増幅を行ったところ, 競合相手 (本実験では *S. mitis*) の DNA 比率が増すにつれて, *S. mutans* 由来 PCR 産物の生成量が減じており, ゲル電気泳動像では 1:100 でごく微量, 1:1,000 では見えないレベルであった. 以上のことから, 細菌に共通の primers を使った universal PCR において, PCR competition が起きていることが再確認された (Fig. 2).

我々は以前に *Mycobacterium* 属菌種を用いた試験で, 同じ primer 結合部位を持つ菌種が混在するサンプルでは, PCR 増幅における競合的阻害が起こり, 多量に存在する DNA が優先的に増幅される事を報告している (河村ら, 1998). 目視可能なゲル電気泳動では, 今回と同様におよそ 1:100 の混合比でマイナー DNA の増幅がほぼ見られなくなった. 光学機器を使用した測定では, 1:10,000 以上の混合比となるとマイナー DNA の増幅が見られなくなった. 一見無視できるほど微量の DNA が増幅されていないように見えるが, 菌数に換算すれば, 10⁶CFU/ml 中の混合菌液中に存在する 10⁴CFU/ml の細菌は, この PCR 増幅で脱落することとなり, 軽視はできないと考えている.

今回, 細菌叢の解析には最も頻繁に使用されている 16S rRNA 遺伝子の universal PCR 用の primers を使

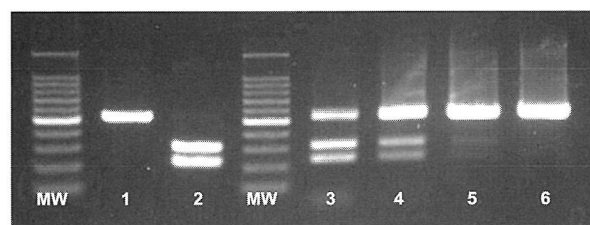


Fig. 2 PCR competition

Bacterial universal PCR amplification (8F+519R) was carried out using various mixtures of *S. mutans* DNA (10pg) and *S. mitis* DNA with different ratios (10pg~10μg). Then amplicon (about 510bp) was treated with restriction enzyme *Spe*-I, which can cut the amplicon from *S. mutans*.

MW: Molecular weight marker (100bp ladder), line1, PCR amplicon from *S. mitis*; line2, PCR amplicon from *S. mutans* which was digested with *Spe*-I; Line 3, 4, 5, 6, PCR amplicon from the DNA mixture of *S. mutans* (10pg) and *S. mitis* (10pg, 100pg, 1μg, 10μg, respectively).

用し、PCR competition が起こっていることを確認し得た。従って、多くの細菌叢解析で最初に PCR 増幅をしている場合には、その段階で少量存在する細菌は無視され、多量に存在する細菌種のみが解析されていると言っても過言ではないと推察される。

DNA-deduction 効率の測定

上述の如く、通常の universal PCR では、メジャーに存在する菌種に埋もれ、マイナーな菌種は検出できていないと考えられた。そこで最初に universal PCR でメジャー菌種ばかりを増幅させ、それを磁性ビーズと結合、もとの検体と混合して DNA hybridization させ、メジャー菌種由来の DNA を除去した後、残ったマイナー集団由来の DNA を使い、その多様性ならびに分類的な検討を行う方法を考案した。具体的には、Fig. 1 に示す方法を実施し、これを DNA deduction 法と命名した。

まず deduction 法により、どれほどの DNA が吸着除去できるか、Real time PCR を用いて deduction 前後のサンプル中の DNA 量を測定し、deduction 効率を測定した。500 ng の DNA を使用し、deduction 操作ならびに吸着用の biotin PCR 産物を加えず、同一操作を行

ったコントロール実験を行ったところ、コントロールでは 308 ng、deduction 操作後には 66 ng の DNA が回収された。このことから 1 回の deduction 操作により、約 78.6% の DNA が吸着除去されたことが判った。別の実験者が行った場合でも約 77% の除去効率が得られており、一度の deduction 操作により 70% 以上の DNA が吸着、除去されていると考えられた。

実際に口腔内サンプルを処理する場合には、吸着除去の deduction 操作を 3 回繰返し、可能な限り、メジャーな菌種由来の DNA を除去するように努めた。

PCR-DGGE 法による細菌叢の変化の確認

口腔内サンプルについて DGGE 解析用の PCR 増幅を行い、8% Gel 変性濃度勾配 20~60% のグラジェントゲルで電気泳動したところ、各サンプルごとに 20~50 本程度のバンドを確認することができた。同一のサンプルについて deduction 処理を行った後、解析したところ、未処理のものに比べ、複数の新たなバンドの出現や、微弱なバンドの増強などが見られた (Fig. 3)。

Deduction 法により、マイナー菌種由来と思われるバンドの出現が確認できたことは、本法の一定の効果と考

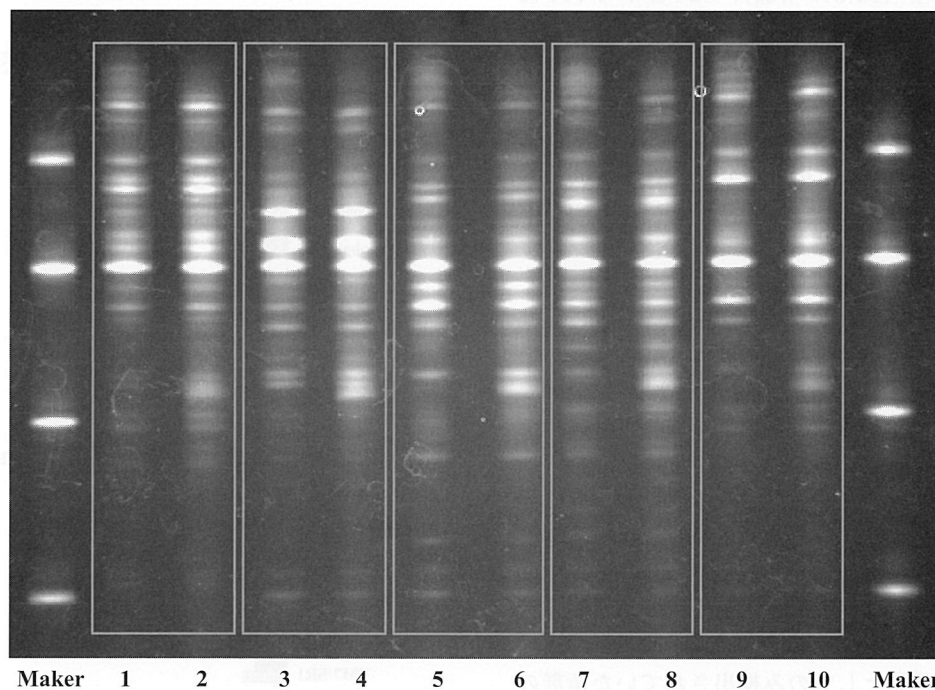


Fig. 3 DGGE profiles before and after PCR-deduction

Maker (from top down) *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mitis*, *Veillonella parvula*, *Rothia mucilaginosa*. Line 1: sample-1, before deduction; Line 2: sample-1, after deduction, Line 3: sample-2 before deduction; Line 4: sample-2 after deduction, Line 5: sample-3 before deduction, Line 6: sample-3 after deduction, Line 7: sample-4 before deduction, Line 8: sample-4 after deduction, Line 9: sample-5 before deduction. Line 10: sample-5 after deduction.

えられた。

さらに種々の条件などを検討したが、メジャー菌種由来バンドの減弱を見ることもできたが、完全には消失しないこと、マイナー菌種由来と思われる新規のバンド数が数本のレベルから向上しないことから、DGGEによる profiling の検出限界の可能性も考えられた。さらに新たに出現したバンドや、シグナルが増強されたバンド部分を切り出し、塩基配列決定を試みたが、信頼性の高い配列を決定できない場合があり、また塩基鎖長が短く、微生物種の特定に繋がられない等の問題があり、別のアプローチを試みる必要性が出てきた。

Metagenome 解析による多様な細菌の検出

新たな解析方法として DNA deduction 前後のサンプルを使い、pyrosequencer を実施、metagenome 解析法を導入した。Deduction 前後の 3 回の実験サンプルにおいて 16,847~113,407 reads のシーケンスを得た (Table 1)。Sample-2 の解析では、9 門、16 綱、26 目、53 科、92 属、401 種に亘る広範囲な微生物が検出できていることが明らかとなった。

Deduction 前後で検出された菌種数を見てみると、224 種から 276 種 (18.8% 増加)、321 種から 401 種 (20.0% 増加)、153 種から 221 種 (30.8% 増加) と、いずれの場合においても、deduction 後の方が、多様性が高く、多くの菌群を検出できていることが判った。

このことより deduction 法により、メジャー菌群由来 DNA を除去することによりマイナーな菌群を検出するという当初の目的に対し一定の成果が得られていると考えられた。

Metagenome の結果を phylum ごとに分けてみたところ、何れのサンプルにおいても deduction 前より処理後の方が、より多くの菌群を見出せていることが判った (Fig. 4)。特に *Proteobacteria* 門については、いずれのサンプルにおいても検出される菌群の数が顕著に増加していることが明らかとなった。

さらに deduction 前後で検出される属についても、各々の属がサンプルにおいて占める割合によって色分けした図にまとめた (Fig. 5)。全体的に deduction 前に比較し、deduction 後では優勢菌種の減少傾向が見られ、且つ deduction 以前では見られなかった属や reads 数が少なく微量菌群としてのみ検出されていた菌群の reads 数の増加などが見られた。

Phylum レベルでの解析で *Proteobacteria* 門の検出菌群数が顕著に増えていたことから、deduction 前後で検出された菌群の塩基配列を使い、系統樹を作成した (Fig. 6)。

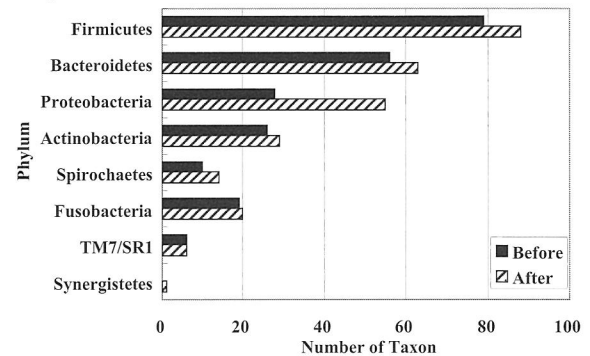
Deduction 前には、class β , γ , δ -*Proteobacteria* の

Table 1 Metagenome analysis -data summary-

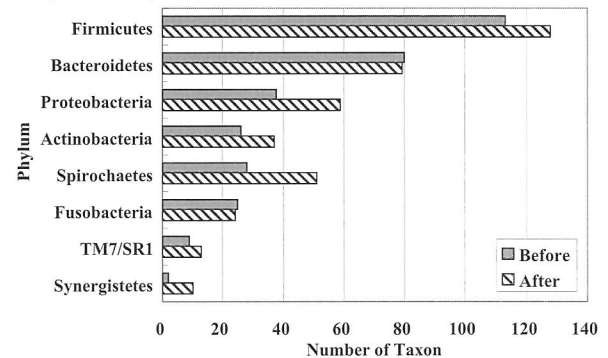
Number of	sample-1		sample-2		sample-3	
	before	after	before	after	before	after
Read	16,847	51,242	48,831	113,407	17,071	16,602
Phylum	8	7	9	9	9	9
Class	13	15	16	16	14	15
Order	18	24	20	26	18	21
Family	28	40	37	53	30	33
Genus	51	76	64	92	47	58
Species	224	276	321	401	153	221

Sequence was determined using Roche 454 FLX-Titanium pyrosequencer. Read sequence length more than 300bp (~500bp) was used for further analysis. Species were assigned if the read sequence showed more than 97% blast similarity to the reference sequence including RDP database.

Sample-1



Sample-2



Sample-3

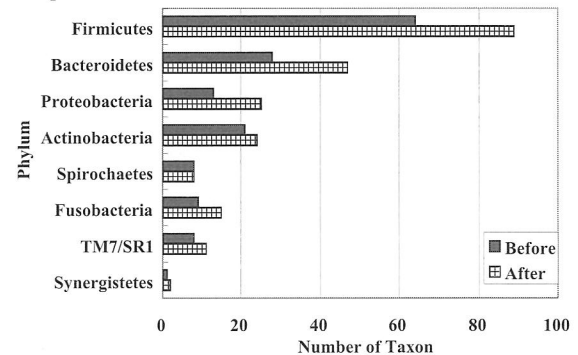


Fig. 4 Metagenome analysis data on the phylum level. Upper and lower bar indicate the number of species detected from "before deduction-DNA" and "after deduction-DNA".

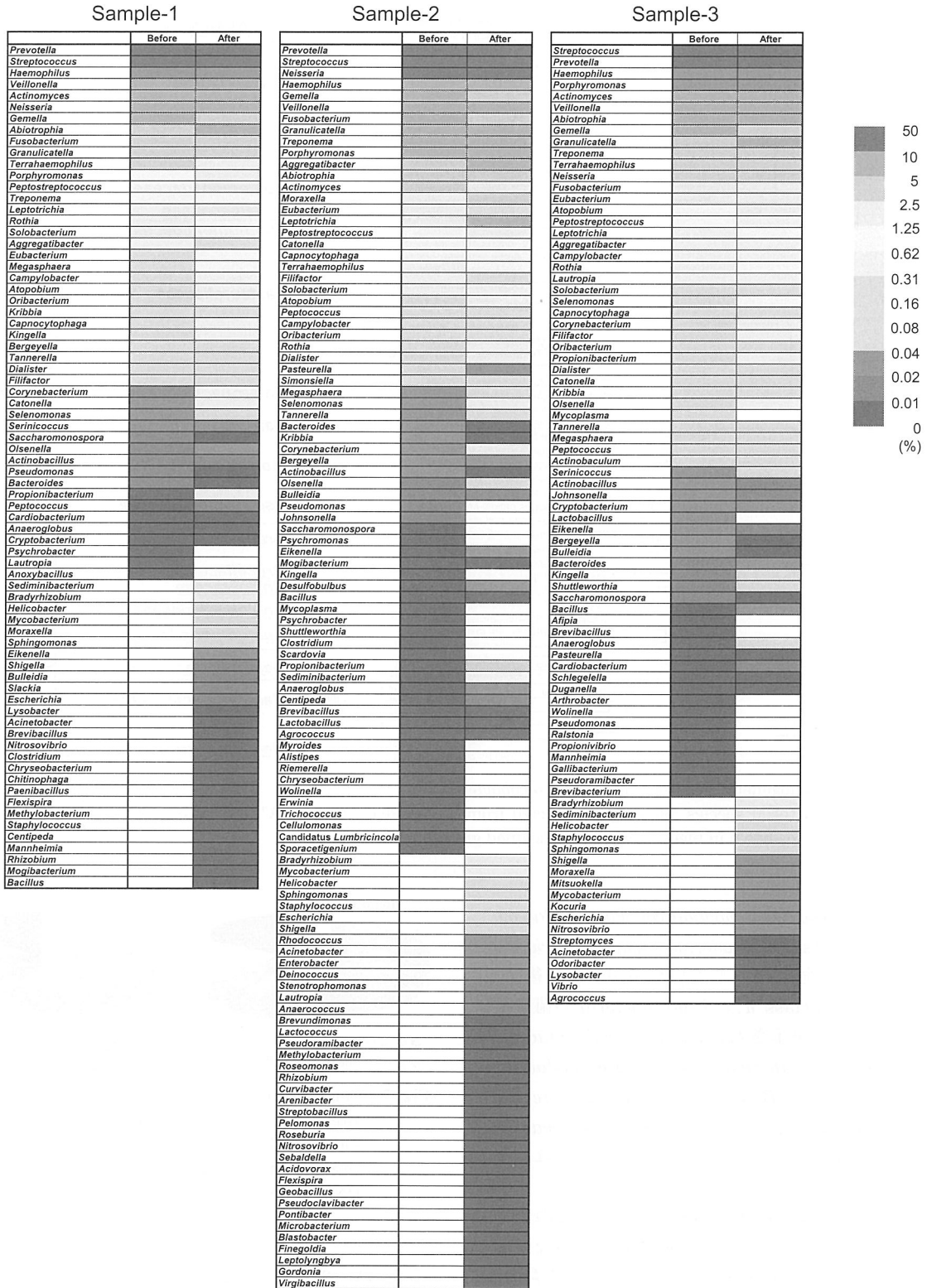


Fig. 5 Metagenome analysis data -relative abundance of bacterial genera-
 The abundance (%) is indicated according to the scale at the right of the plot.
 Left and light columns on each sample represents the relative abundance of bacterial
 genera detected from "before deduction-DNA" and "after deduction-DNA".

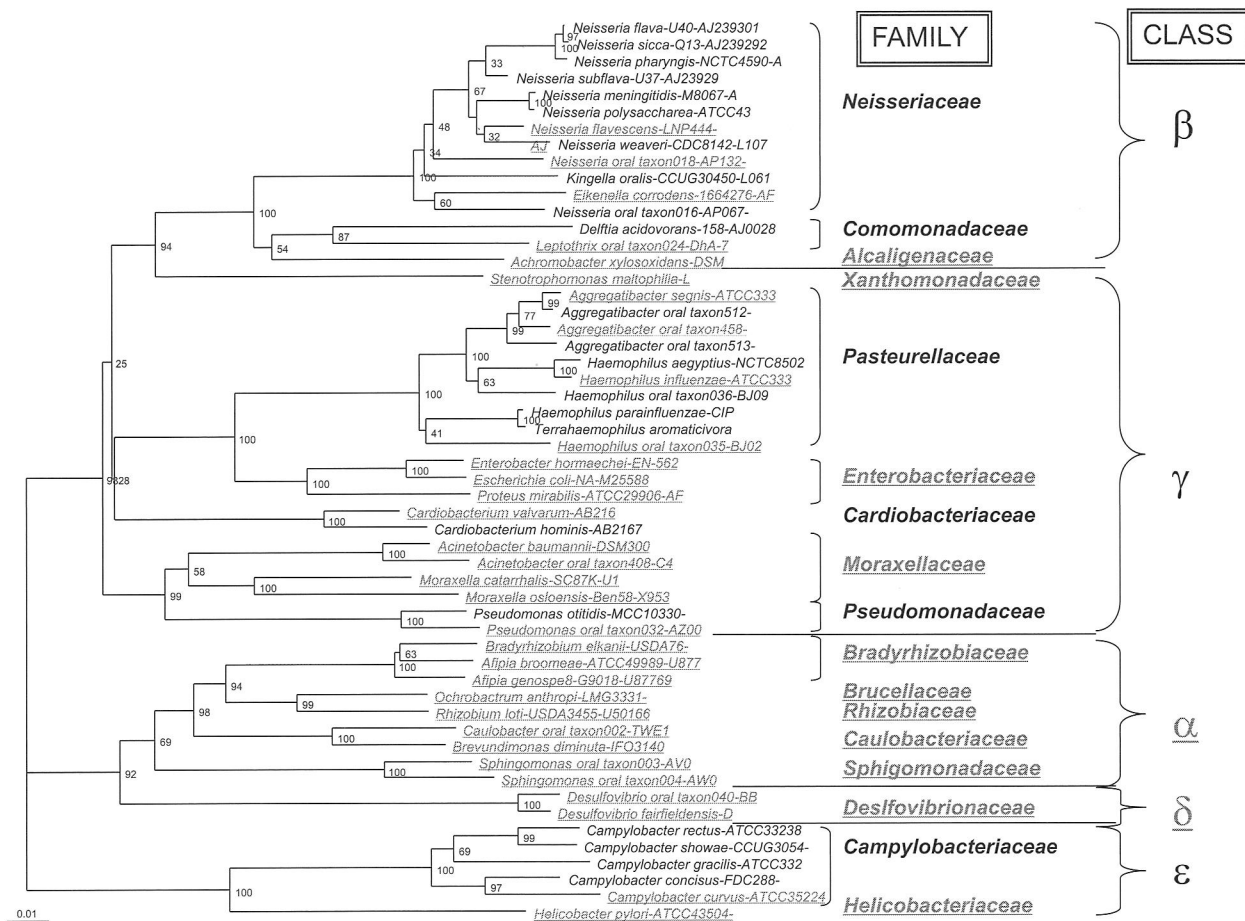


Fig. 6 Phylogenetic tree of the phylum Proteobacteria.

Bacterial species /phylotypes detected from "before deduction-DNA" and "after deduction-DNA" were shown in black color and underlined gray color, respectively.

Family Neisseriaceae, Comamonadaceae, Pasteurellaceae, Cardiobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Campylobacteriaceae の6科の28種しか検出されていないが、deduction後は、上述の菌群に加え、class α , δ -Proteobacteria の菌群が存在していることが示され、Family Alcaligenaceae, Xanthomonadaceae, Enterobacteriaceae, Moraxellaceae, Bradyrhizobiaceae, Brucellaceae, Rhizobiaceae, Caulobacteriaceae, Sphigomonadaceae, Desulfovibrionaceae, Helicobacteriaceae の11科、27種が新たに検出され、合計55種を見出すことができた。

検出された種を基に deduction 前後の細菌叢の変化についてまとめたところ、deduction 処理を施さない場合には、*S. mitis* や *Prevotella melaninogenica* などを含め、上位10菌種のデータが47.5%を占めていた (Fig. 7)。逆にマイナーな菌群を含むデータは52.5% (263種) に留まった。Deduction 後には、上位10菌種のデータは37.7%に減じ、代わってマイナーな菌群を含むデータ

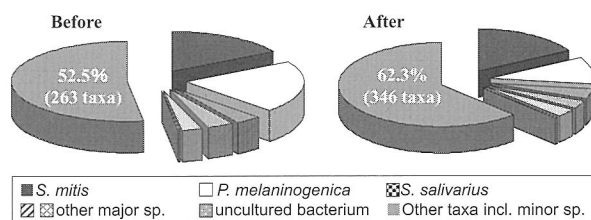


Fig. 7 Comparison of the detected organism before and after applying deduction technique.

Plotted values are mean sequence abundances in each species, detected from "before deduction-DNA" (left) and "after deduction-DNA" (right).

は62.3% (346種) となり、およそ80種が新たに検出されていた。これらの中には、*Bradyrhizobium japonicum*, *Propionibacterium acnes*, *Mycobacterium chitae* や *Helicobacter cinaedi* など、これまで口腔内から分離された報告のないものが多数含まれていた。

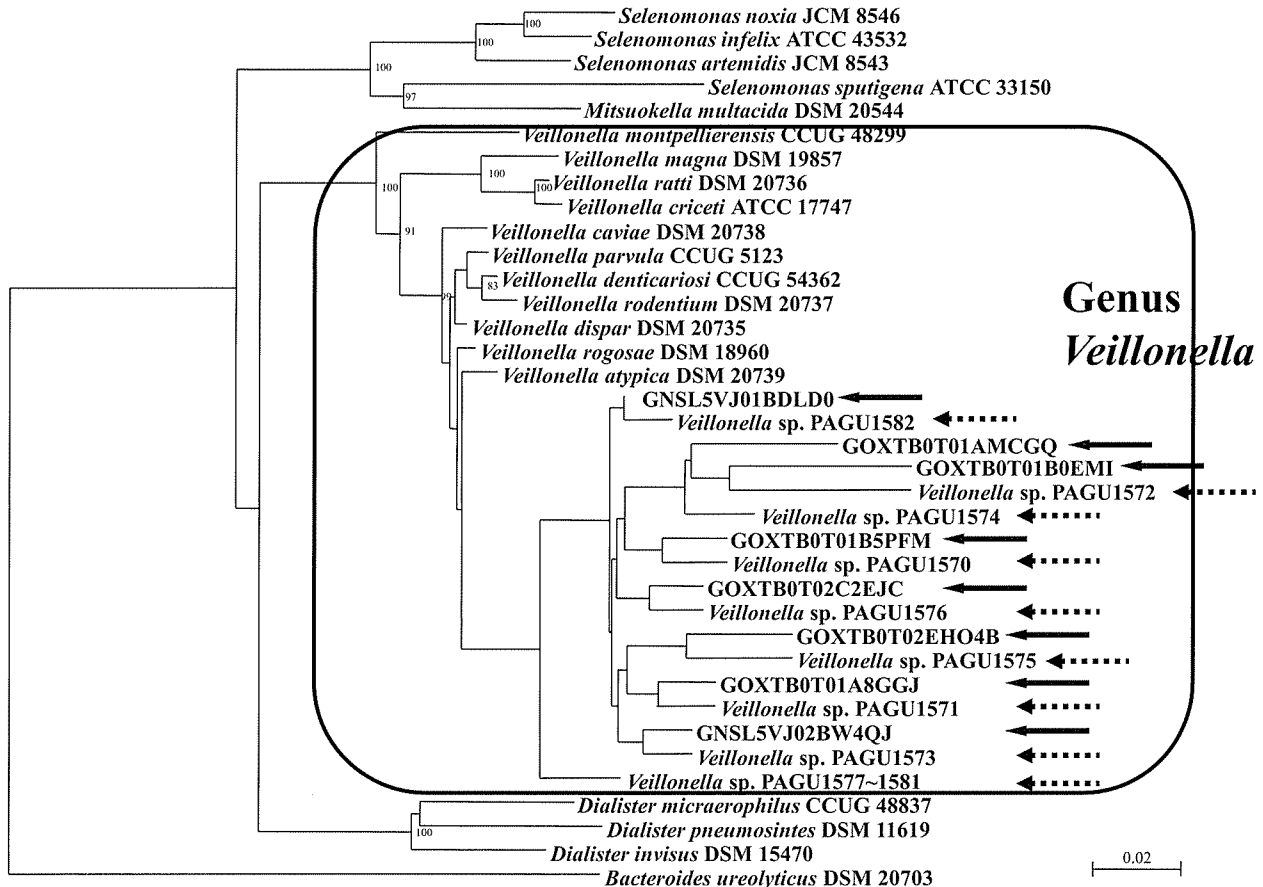


Fig. 8 Phylogenetic tree of the genus *Veillonella* based on pyrosequence data and unidentified isolates. Sequence data from isolates and pyrosequence were depicted with solid lined arrow and dotted lined arrow.

今回我々は、metagenome 解析を実施した結果、詳細かつ膨大なデータを得ることができた。

特に注目し値すべきは、Fig. 6 である。Deduction 前のサンプルとは、すなわち唾液サンプルから抽出した DNA を何も特別な処理をせず直接解析したものに相当する。その場合に Phylum *Proteobacteria* において、たった28種(3 class, 6 family)しか検出できないことを示している。これに対し deduction 処理を施すと、Phylum *Proteobacteria* の5つ全ての class が検出され、55種(5 class, 11 family)と、処理前のほぼ倍の多様な菌群を検出することができた。

当初、deduction 法を適応して、メジャー菌群由来の DNA を可能な限り多く除去し、マイナー菌群のみのデータを得たいと考えていたが、実際には DGGE でも metagenome 解析でも、メジャー菌群のみを除くという結果には至らなかった。しかしながら、deduction 後のサンプルからは、非常に多様性のあるデータが得られており、さらに deduction 前に検出されている菌群は、

ごく一部の例外を除いて、すべて検出されているため、deduction 法を適応することにより、メジャー菌群からマイナー菌群まで、網羅して検出できたと考えられた。

Metagenome 解析における分離株の系統解析

Metagenome 解析によって得られたシーケンスを用いて、*Veillonella* 属の系統樹を作成し、我々が、以前に口腔サンプルより分離していた *Veillonella* 属の未同定株について、系統解析を行った (Fig. 8)。未同定株は、多くの既存菌種とは95%以下の類似度しか示さなかったが、metagenome 解析により検出された一部のシーケンスと同一のクラスターを形成していることが明らかとなった。

我々は、metagenome データを得た当初は、既存菌種と余りに大きく隔たっていることから、まずデータの信頼性を疑った。Blast 解析などで chimera 増幅 (Wang & Wang, 1996) の可能性を探ったが、そのような兆候を見出すことはできなかった。そこで既に口腔内より分離

培養し得ていた未同定株と比較検討してみたところ、高い類似性を示すことが明らかとなった。従って reads の信頼性に問題はなく、系統的に若干かけ離れた新たな菌群を見出すことに成功したとの認識に至った。現在、これらの菌株については、新菌種提案のための分類学的データの収集を行っている。

口腔内微生物多様性の解析において、多くの研究者は 16S rRNA 遺伝子の相関を用いて菌種の特定を行っている (Avila *et al.*, 2009)。近年、pyrosequencing 等の新しい技術の導入により、シークエンスを得るための手法は効率的なものとなり、より多くのシークエンスが得られるようになってきた (Chen *et al.*, 2010)。より多くの品質のよいシークエンスを用いてデータベースを構築することは、ヒトの microbiome 研究に基盤として用いることができるであろう (Peterson *et al.*, 2009)。

本研究の特筆すべき点は、DNA-deduction 処理を用いることによって、通常のユニバーサルプライマーを用いた手法では検出することができなかつた微量菌群を検出することができ、細菌叢の新たな一面を発見することができた点にある。メジャー菌群由来の DNA を完全に除去し切れなかったことから、deduction の手法が最適化しているとは言い切れない。今回、deduction 操作の中の hybridization における反応条件は 56℃ と幅広く交雑が可能となるような温度であり、メジャー菌群だけでなく、マイナー菌群に属する菌種なども除去されている可能性も否定できない。Hybridization の反応温度やイオン強度を変化させることにより、より優勢菌種に限定的な交雑を形成させることができるため、より多くのマイナー菌群の菌種が検出できると考えられる。また、プライマーとの反応性も検出される菌種に隔たりが出る原因となるため (Kroes *et al.*, 1999)、用いるプライマーを変化させることで得られる菌種に違いが出る可能性も考えられる。

口腔内細菌叢に通常に存在する細菌が、病原性細菌種の直接的な宿主細胞への反応を調整し、相対的に病原性を緩衝するメカニズムが報告されている (Mans *et al.*, 2009)。一例として主要な口腔内疾患であるう蝕では、プラーク内 pH が低下し、その状態が維持されるようになると mutans streptococci (*S. mutans*, *S. sobrinus* *etc*) などの低 pH に適応するう蝕関連菌の割合が高くなり、やがて細菌叢のシフトがおき、う蝕の発症に繋がる (河村ら, 2010)。

また、多様性のさらなる特徴描写は健康人と疾病の関係の説明の際に大きな手助けとなる (Nasidze *et al.*, 2009)。微量菌種解析の発展によって、口腔内細菌の全容が明らかになると、口腔内の主な疾患であるう蝕や歯周病の治療や予防だけではなく、他の感染症における治

療や予防にも役立つことができると考えられる。

Metagenome 解析は口腔内細菌と腸内細菌との比較に用いられている報告もあるため (Maukonen *et al.*, 2008)、DNA-deduction も同様に、唾液などの口腔内細菌叢だけではなく、腸内細菌叢などの他の部位の細菌叢の解析にも有用な手法となり得るだろう。

要 約

近年、口腔内細菌や腸管内細菌に代表される細菌叢の構成菌種を分生物学的な手法により、解析する試みが行われている。分子生物学的なアプローチでは、多様な細菌叢を網羅的に解析するため、16S rRNA の共通領域を使った universal PCR 増幅が行われるのが一般的である。しかし universal PCR では、多量に存在するメジャーな菌群ばかりが増幅され、少量存在しているマイナー菌群は、脱落してしまうという欠点がある。

本研究では、検体から予めメジャー菌群由来の DNA を除去し、その後 PCR 増幅をすることにより、これまで見過ごされてきたマイナー菌群も解析し、口腔内細菌叢の多様性を解明することを目的として実験を行った。

この目的のため DNA-deduction 法という方法を新たに開発した。本方法により、一度の操作で検体 DNA の約 70% を吸着除去できることが判った。本手法を適応した後に DGGE 解析を行ったところ、新たなバンドを見出すことができた。さらに pyrosequencer を使い metagenome 手法で詳細に解析したところ、deduction 前 (すなわち検体をそのまま解析したものに相当) に比べ、処理後は、18~30% ほど多くの菌群を検出できていることが判った。門、属および種のレベルで解析したところ、マイナー菌群を含め、多様性高く、多くの菌群を検出できていることが判った。

新たに開発した deduction 法によりメジャーな菌群からマイナーな菌群まで同時に検出できることが示され、これまでの手法以上に極めて有用であると考えられた。

本助成で得られた研究成果の報告

シンポジウム、招待講演

- 1) 河村好章. 口腔細菌と歯周病 - 微生物叢の解析方法の現状とその適応範囲を踏まえて. シンポジウム「常在微生物の解析とその制御による疾患の克服」. 第129年回日本薬学会年次総会, 京都, 2009.
- 2) 河村好章. 細菌の分類同定に使われる方法論とヒトの消化管に生息する細菌の分類命名に関する情報. 第12回日本臨床腸内微生物学会総会. 教育講演, 岐阜, 2009.
- 3) 河村好章. 食中毒を引き起こす微生物の特徴. 平成21年度長野県食品添加物協会講習会. 長野, 2009.

口頭・ポスター発表

- 1) 神谷保吉, 藤高由貴, 富田純子, 森田雄二, 河村好章. 検出困難なマイナー菌群を含む口腔内細菌叢の多様性解析について. 平成22年度日本薬学会東海支部例会, 静岡, 2010.
- 2) Kawamura, Y., Kamiya, Y., Fujitaka, Y., Tomida, J. & Morita, Y. Metagenome analysis of saliva microbiota in healthy Japanese adults. 88th General session and Exhibition of the IADR, Barcelona (Spain), 2010.
- 3) 神谷保吉, 藤高由貴, 富田純子, 森田雄二, 河村好章. 16S rRNA 遺伝子を標的とした口腔内細菌叢における微量細菌群の解析. 第131回日本薬学会年次総会, 静岡, 2011.
- 4) 神谷保吉, 富田純子, 森田雄二, 平川英樹, 河村好章. メタゲノム解析を用いた口腔内細菌叢におけるstreptococciの分布. 第20回Lancefieldレンサ球菌研究会, 名古屋, 2011.

総説

- 1) 河村好章. 細菌叢の解析に使われる方法論およびその系統分類に関する情報. 臨床腸内微生物学会誌, 12: 3-13, 2010.
- 2) 河村好章, 長谷川義明, 佐藤拓一. 口腔内細菌叢のコントロール. ファルマシア誌, 46: 929-933, 2010.

保存機関に寄託した菌株

本研究助成により見出された新分類群に属する以下の菌株は, 現在分類学的検討を終えつつあり, 新種提案に併せて保存機関に寄託予定である.

Porphyomonas sp. PAGU 1600
Porphyomonas sp. PAGU 1601
Porphyomonas sp. PAGU 1602
Porphyomonas sp. PAGU 1603
Veillonella sp. PAGU 1579
Veillonella sp. PAGU 1580
Veillonella sp. PAGU 1581

謝 辞

本研究に対し, 3年間助成して頂いた公益財団法人発酵研究所の関係者の皆様に心よりお礼申し上げます. Metagenome dataの解析を実施して頂いた, かずさDNA研究所平川英樹博士, さらに歯科医師, 歯科専門家として常にアドバイスを頂きました東北大学大学院歯学研究科佐藤拓一博士に深謝致します. 本研究室に所属し関連の研究に携わった多くの卒論学生に感謝致します. 実験をサポートしてくれた森田雄二博士, 富田純子博士, 旗崎恭子技師に感謝いたします.

なお, 本研究は, 神谷保吉氏が, 薬科学修士学位論文

研究として行ったものです.

文 献

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I. & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 5721-5732.
- Avila, M., Ojcius, D. M. & Yilmaz, O. (2009). The oral microbiome a permanent guest. *DNA Cell Biol.* **28**: 405-441.
- Chen, T., Yu, W. H., Baranova, O. V., Lakshmanan, A. & Dewhirst, F. E. (2010). The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbiome taxonomic and genomic information. Database (Oxford). *Baq013*.
- Faveri, M., Mayer, M. P., Feres, M., de Figueiredo, L. C., Dewhirst, F. E. & Paster, B. J. (2008). Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiol. Immunol.* **23**: 112-118.
- 河村好章, 福永肇, 広瀬健治, 江崎孝行 (1998). LCR-MTB システムの基礎検討. *臨床と微生物* **25**: 873-874.
- 河村好章 (2010). 細菌の分類同定に使われる方法論とヒトの消化管に生息する細菌の分類命名に関する情報. *日本臨床腸内微生物学会誌* **12**: 3-13.
- 河村好章, 長谷川義明, 佐藤拓一 (2010). 口腔内細菌叢のコントロール. *日本薬学会誌* **46**: 929-933.
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J. Jr., Periasamy, S. & Jakubovics, N. S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 471-480.
- Kroes, I., Lepp, P. W. & Relman, D. A. (1999). Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 14547-14552.
- Lenander-Lumikari, M. & Loimaranta, V. (2000). Saliva and denta caries. *Adv. Dent. Res.* **14**: 40-47.
- Mans, J. J., von Lackum, K., Dorsey, C., Willis, S., Wallet, S. M., Baker, H. V., Lamont, R. J. & Handfield, M. (2009). The degree of microbiome complexity influences the epithelial response to infection. *B. M. C. Genomics.* **10**: 380.
- Maukonen, J., Mättö, J., Suihko, M. L. & Saarela, M. (2008). Intra-individual diversity and similarity of salivary and faecal microbiota. *J. Med. Microbiol.* **57**: 1560-1568.
- Nasidzem, I., Quinquem, D., Lim, J., Lim, M., Tangm, K. & Stoneking, M. (2009). Comparative analysis of human saliva microbiome diversity by barcoded pyrosequencing and cloning approaches. *Anal. Biochem.* **391**: 64-68.
- Page, R. D. (1996). TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**: 357-358.
- Perriere, G. & Gouy, M. (1996). WWW-query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie.* **78**: 364-369.
- Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang,

- L., Schloss, J. A., Bonazzi, V., McEwen, J. E., Wetterstrand, K. A., Deal, C., Baker, C. C., Di Francesco, V., Howcroft, T. K., Karp, R. W., Lunsford, R. D., Wellington, C. R., Belachew, T., Wright, M., Giblin, C., David, H., Mills, M., Salomon, R., Mullins, C., Akolkar, B., Begg, L., Davis, C., Grandison, L., Humble, M., Khalsa, J., Little, A. R., Peavy, H., Pontzer, C., Portnoy, M., Sayre, M. H., Starke-Reed, P., Zakhari, S., Read, J., Watson, B. & Guyer, M. (2009). The Human Microbiome Project. *Genome Res.* **19**: 2317-2323.
- Sakamoto, M., Umeda, M. & Benno, Y. (2003). Molecular analysis of human oral microbiota. *J. Periodont. Res.* **40**: 227-285.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882.
- Wommack, K. E., Bhavsar, J. & Revel, J. (2008). Metagenomics: read length matters. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 1453-463.
- Wang, G. C. & Wang, Y. (1996). The frequency of chimeric molecules as a consequence of PCR co-amplification of 16S rRNA genes from different bacterial species. *Microbiology*, **142**: 1107-1114.
- Wang, X., Heazlewood, S.P., Krause, D. O. & Florin, T. H. (2003). Molecular characterization of the microbial species that colonize human ileal and colonic mucosa by using 16S rDNA sequence analysis. *J. Appl. Microbiol.* **95**: 508-520.
- 渡辺幸一 (2007). 腸内フローラの分子生物学的解析法の応用と課題. *腸内細菌学会誌* **21**: 199-208.

深海底熱水活動域に優占する難培養性化学合成微生物の 遺伝学的分類および保存法に関する研究

中 川 聡

海洋研究開発機構極限環境生物圏研究センター¹

〒237-0061 横須賀市夏島町 2-15

Genetic analysis and preservation of chemolithoautotrophic bacteria dominating deep-sea vents

Satoshi Nakagawa

Extremobiosphere Research Center, Japan Agency for Marine-Earth Science and
Technology (JAMSTEC), 2-15 Natsushima-cho, Yokosuka 237-0061, Japan²

Chemoautotrophic *Epsilonproteobacteria* are widely distributed and support ecosystems in sulfidic environments as primary producers of organic matter. Their genomes lack many DNA-repair genes, probably resulting in increased diversity within the population. To assess their genotypic diversity, we developed a multilocus sequence analysis (MLSA) scheme for representative deep-sea vent *Epsilonproteobacteria* isolates. Sequence variation was determined in 11 different housekeeping genes of 49 *Sulfurimonas* strains that originated from 9 different hydrothermal fields of the Western Pacific, Central Indian Ridge, and Mid-Atlantic Ridge. The analysis revealed substantial genetic variation within the genus *Sulfurimonas* population, with an average of 28 alleles per locus, and a total of 48 unique allelic profiles were found. Intragenic recombination was revealed in several genes but was shown to be a weaker force than mutation in the divergence of deep-sea vent *Sulfurimonas* members. A phylogenetic tree inferred from all concatenated loci led to the identification of geographic barriers isolating epsilonproteobacterial populations. Linkage disequilibrium analysis supported a clonal population structure, probably reflecting geographical separation and/or selection for particular alleles of these genes. In addition, these strains were successfully preserved in glass capillaries in a liquid nitrogen container. This study represents the first MLSA on the dominant deep-sea vent chemoautotrophs.

Key words: Deep-sea hydrothermal fields, Chemoautotrophs, MLSA, *Epsilonproteobacteria*

緒 言

Epsilonproteobacteria 綱は, *Helicobacter pylori* (胃潰瘍や胃癌の原因菌) や *Campylobacter jejuni* (腸炎等

の原因菌) のような病原性微生物を主要構成種とする系統グループであると認識されてきた (On, 2001). しかし近年, 本綱に極めて多様な化学合成独立栄養微生物が含まれることが明らかとなった (Nakagawa & Takai, 2008). 化学合成独立栄養性の *Epsilonproteobacteria* は, 還元硫黄化合物の存在する様々な環境に広く分布しており, 例えば陸域の洞窟 (Engel *et al.*, 2010) や海洋の酸化還元境界 (Labrenz *et al.*, 2005; Yakimov *et al.*, 2007), 深海底熱水活動域 (Moyer *et al.*, 1995; Polz & Cavanaugh, 1995) に優占して検出されている. 深海底熱水活動域に優占する *Epsilonproteobacteria* は, 様々な無脊椎動物に細胞内あるいは細胞外共生するものや (Polz & Cavanaugh, 1995; Cary *et al.*, 1997;

¹ 現所属機関:

北海道大学大学院水産科学研究院

〒041-8611 函館市港町 3-1-1

E-mail: nakagawa@fish.hokudai.ac.jp

共同研究者: 左子芳彦 (京都大学)

² Present address:

Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University,

3-1-1 Minato-cho, Hakodate 041-8611, Japan

Email: nakagawa@fish.hokudai.ac.jp

Nakagawa *et al.*, 2005a; Suzuki *et al.*, 2005; Urakawa *et al.*, 2005), チムニー構造物や熱水/海水の混合域において自由生活するもの (Moyer *et al.*, 1995; Reysenbach *et al.*, 2000; Nakagawa *et al.*, 2005a, 2005b) など多様なライフスタイルを有している。本微生物群は常温性から中等度好熱性で、水素や還元的硫黄化合物を電子供与体とする化学合成微生物である (Nakagawa *et al.*, 2005c; Nakagawa & Takai, 2008)。ゲノム解析の結果、本微生物群は病原性近縁種と同様に殆どの DNA 修復遺伝子を欠失しており、突然変異や組換え・水平伝播等が頻繁に生じる柔軟なゲノムを有すると考えられている (Nakagawa *et al.*, 2007; Sievert *et al.*, 2008; Ambur *et al.*, 2009; Sikorski *et al.*, 2010)。これまで、16S rRNA 遺伝子の塩基配列レベルでは区別できない *Epsilonproteobacteria* が、地理的に遠く離れた深海底熱水活動域から度々検出されているが、本微生物群において孢子形成能を持つものは知られておらず、それらが如何に分散しているか、さらにはゲノムレベルでの関連性や群集遺伝学的な性状を解析した例はない。

近年、微生物のもつ高度なゲノム柔軟性が注目を浴びており (Glaser *et al.*, 2001; Perna *et al.*, 2001; Mira *et al.*, 2002; Roca *et al.*, 2003), 特に個体群内でのゲノム不均一性は、微生物の生態や環境適応・進化過程を理解するうえで不可欠であると考えられるようになった (Welch *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2005; Coleman *et al.*, 2006)。微生物におけるゲノムの不均一性は、randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), パルスフィールド電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis [PFGE]), 増幅断片長多型 (amplified fragment length polymorphism [AFLP]), 多遺伝子座配列解析 (multilocus sequence analysis [MLSA]) 等、様々な手法で評価することが可能である (Maiden *et al.*, 1998; Gevers *et al.*, 2005)。中でも MLSA 法は、複数 (通常は 7 種類以上) のハウスキーピング遺伝子の塩基配列を組み合わせて用いる手法であり、個々の微生物株の遺伝子型を明確に区別し、定量的な群集遺伝学的解析や進化学的解析が可能のため一般化しつつある (Maiden *et al.*, 1998; Maiden, 2006)。 *Epsilonproteobacteria* 綱の微生物の中では、 *Helicobacter* 属や *Campylobacter* 属の微生物が本手法により解析され、既に充実したデータベースが構築され (Achtman *et al.*, 1999; Dingle *et al.*, 2001), 疫学的研究のみならず人類との共進化過程を解明する研究等に利用されてきた (Falush *et al.*, 2003; Linz *et al.*, 2007)。近年、MLSA 法は病原性微生物のみでなく、非病原性微生物群 (de Las Rivas *et al.*, 2004; Baldo *et al.*, 2006; van Berkum *et al.*, 2006; Ivars-Martínez *et al.*,

2008; Oh *et al.*, 2010), さらには培養が極めて困難な微生物 (Vergin *et al.*, 2007) にも適用されるようになってきている。しかし、これまで深海底熱水活動域に優占する微生物に本手法が適用された例は皆無である。その理由の 1 つに、現場で優占する化学合成 *Epsilonproteobacteria* が培養困難である (Polz & Cavanaugh, 1995) ことが挙げられるが、筆者らの研究グループは本微生物群の培養法を確立し、世界各地の深海底熱水活動域から数多くの多様な分離株を獲得してきた (Takai *et al.*, 2003; Nakagawa *et al.*, 2005a, 2005b)。深海底熱水活動域に棲息する *Epsilonproteobacteria* が有すると考えられるゲノム柔軟性やその広い分布様式を考慮すると、本微生物群は深海底熱水活動域に優占する微生物の MLSA 解析を行う理想的なターゲットである。以上の背景から、本研究では、世界各地の深海底熱水活動域から分離した *Epsilonproteobacteria* の分離株について、MLSA 解析により群集遺伝学的性状を解明すると共に、分離株の保存法について検討した。

実験方法

分離株 これまでの研究において、西太平洋・インド洋・大西洋に位置する 9 カ所の深海底熱水活動域 (Fig. 1) から獲得してきた *Epsilonproteobacteria* 分離株のうち、16S rRNA 遺伝子の塩基配列が互いに 99.9% 以上相同な *Sulfurimonas* 属の計 49 株 (MLSA1-95 株) を選抜した。なお、これらの分離株は *Sulfurimonas autotrophica* OK10^r (Inagaki *et al.*, 2003) と 99.9% 以上の相同性 (16S rRNA 遺伝子の塩基配列レベル) を有している。

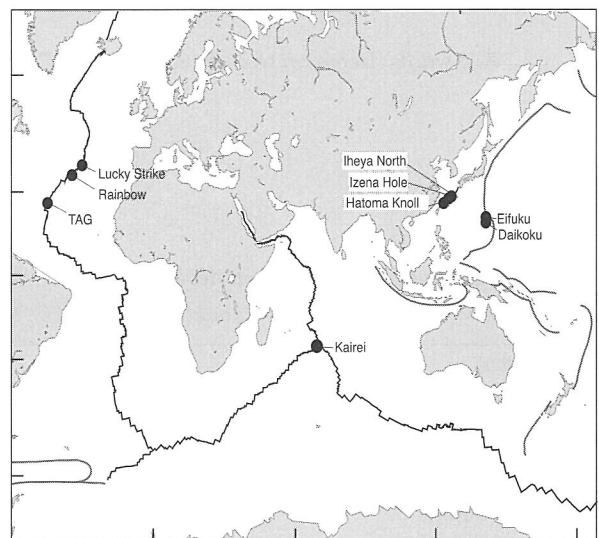


Fig. 1 Map of hydrothermal fields where *Sulfurimonas* strains used in this study were isolated.

分離に際しては、海洋性水素／硫酸化細菌用の MMJHS-1 培地および MMJHS-2 培地による希釈培養法を用いて、チムニー構造物や海水試料等から優占種を集積培養した後、限界希釈により純化した (Nakagawa *et al.*, 2005a)。

MLSA 遺伝子の塩基配列の決定 本研究では、計49株の分離株それぞれについて、11種類のハウスキーピング遺伝子 (*glyA*, *tkl*, *atpA*, *rplA*, *dnaK*, *pheS*, *napA*, *metG*, *feoB*, *gyrB*, *valS*) の塩基配列を決定した (Table 1)。これらの遺伝子は、ゲノム上にシングルコピーで位置に偏りが少なく、かつ浄化選択を受け進化速度が遅い (非同義置換と同義置換の比が1より遥かに小さい)、といった MLSA 法に用いる遺伝子 (以下 MLSA 遺伝子) に要求される条件 (Maiden *et al.*, 1998; Hurst, 2002;

Urwin & Maiden, 2003) を満たすものである。全ゲノム解析の終了している *Epsilonproteobacteria* の配列を参考にプライマーを設計し (Table 1), PCR による増幅の後 ABI 3130xl (Applied Biosystems) を用いて各遺伝子の塩基配列を決定した (Nakagawa *et al.*, 2005a)。決定した各遺伝子の塩基配列を Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) によりアラインしたところ、*napA* 遺伝子に1箇所のみギャップが挿入されたため、当該のポジションは以下の解析から除外した。

塩基配列の解析 MLSA 解析で一般に用いられる手法に基づき、得られた塩基配列を解析した。概要を述べると、各 MLSA 遺伝子における多様性や同義置換／非同義置換等の特徴 (Table 2 に記載したものは、DnaSP 4.5 および MEGA 4 ソフトウェア (Rozas *et al.*, 2003; Tamura *et al.*, 2007) を用いて算出した。また、遺伝子組換えの有無は RDP 3 ソフトウェアにより求め (Martin *et al.*, 2005)、組換え頻度・突然変異頻度は LDhat により算出した (McVean *et al.*, 2002)。さらに、最尤系統樹は RAxML を用いて作成し (Stamatakis *et al.*, 2008)、系統樹間のトポロジー比較は SH 検定により行なった (Shimodaira & Hasegawa, 1999)。

分離株の保存 *Sulfurimonas autotrophica* OK10^T は絶対好気性と報告されているが (Inagaki *et al.*, 2003)、本研究で用いた *Sulfurimonas* 属の分離株は全て通性嫌気性であるため、その保存法に際しては、嫌気性微生物の保存に適したキャピラリー凍結保存法 (伊藤, 2002) に準拠した。プチルゴム栓および穴あきネジ口キャップを取り付けることのできる遠沈管 (50 ml 容) を自作し、培養からキャピラリー中での保存までを全て嫌気的に行ない、液体窒素タンクにて保存した。なお、分散媒は10% グリセリンもしくは5% ジメチルスルホキシド (DMSO) を含む嫌気人工海水を用いた。

結果と考察

MLSA 遺伝子の多様性 49株の *Sulfurimonas* 属それぞれについて、計11種類の MLSA 遺伝子の部分塩基配列 (平均約 530 bp) を決定した。各配列の GC 含量は約 36% (*gyrB* 遺伝子) から 43% (*glyA* 遺伝子) の範囲であり、全ての MLSA 遺伝子での平均値は約 39% であった。なお、分離株に近縁な *Sulfurimonas autotrophica* OK10^T のゲノム DNA の GC 含量は 35.2% である (Inagaki *et al.*, 2003; Sikorski *et al.*, 2010)。また、本研究で採択した MLSA 遺伝子は、主に病原性近縁種の MLSA において解析されているもの (Achtman *et al.*,

Table 1 MLST loci and primers used in this study

Gene	Gene product or inferred function ^a	Primer sequence (5'→3')
<i>glyA</i>	serine hydroxymethyltransferase (E)	GCNGTYATGGARGCBATGGG CTTCTTGTCCTCCDGGAAAC
<i>tkl</i>	transketolase (G)	TGTHNTGYGGTGAYGGAG TCTTCNCCHACRCCGATRCT
<i>atpA</i>	ATP synthase, alpha subunit (C)	CAAYGTTATGGCWGGAGA ACGTCACCWGCYTGWGTTC
<i>rplA</i>	50S ribosomal protein L1 (J)	CCDAGACAYGCDGAYCARATG GGCATHADRCCTTTDGGBC
<i>dnaK</i>	chaperone dnaK (O)	AGAAAAGCGACAAAAGADGC GCNACMACTTCATCAGRRT
<i>pheS</i>	phenylalanyl-tRNA synthetase, alpha subunit (J)	CCNGCAMGWGATATGCARGA CCRAANGCATAWCCRCTTACAT
<i>napA</i>	periplasmic nitrate reductase, large subunit (C)	TTCTGYGGTACDGGHTGTGG GRITCATACCCATYGTCCA
<i>metG</i>	methionyl-tRNA synthetase (J)	ACNGGHACNGAYGARCAYGG GCHGGCCARTAVAYNGCATG
<i>feoB</i>	ferrous iron transport protein B (P)	GGBCAGCCHAATGTDGGVAA CATRTAVCCHGTVSTYTC
<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B (L)	GGWYTKCAYGGBGTBGBGT CVACRTCVGCATCGGTCT
<i>valS</i>	valyl-tRNA synthetase (J)	CTAYATGRTHAAYTGTTG CCCAGAAAAABADDATRTC

^aLetters in parenthesis correspond to the COG classification of genes (Tatusov *et al.*, 2000). E, Amino acid transport and metabolism; G, Carbohydrate transport and metabolism; C, Energy production and conversion; J, Translation, ribosomal structure and biogenesis; O, Posttranslational modification, protein turnover, chaperones; P, Inorganic ion transport and metabolism; L, Replication, recombination and repair.

1999; Dingle *et al.*, 2001) を用いたが, 各 MLSA 遺伝子の非同義置換と同義置換の比 (Ka/Ks 値) は 1 より遙かに小さいことから (Table 2), 今回選択した遺伝子群はいずれも MLSA 解析に適したものと判断できる. 各 MLSA 遺伝子の塩基配列を種類分けしたところ, 16種類 (*rplA* 遺伝子) から 32種類 (*pheS* 遺伝子と *feoB* 遺伝子) もの対立遺伝子が見つかり, 平均すると遺伝子あたり約 28種類であった (Table 2). 49株のうち 2株 (MLSA 4株と MLSA21株) のみが全く同じ MLSA 遺伝子群を有していたが, 他は全てが互いに異なる配列を有しており, 分離株群のゲノムレベルの多様性が極めて高いことが明らかとなった. 深海底熱水活動域に優占する *Epsilonproteobacteria* は, ゲノム中に DNA 修復系を欠失しているためゲノムレベルの多様性が高いと考えられるが, ゲノムの不均一性が高いことは物理化学的変動の激しい熱水活動域に適応するためには有利に働くと考えられる (Nakagawa *et al.*, 2007). 加えて, 各分離株が有する対立遺伝子の種類の組み合わせに基づき

Table 2 Genetic features of MLSA loci

Gene	AVI ^a (SD)	GC content (%)	No. of alleles	% of variable sites	Nucleotide diversity per site (π)	Average Ka/Ks ratio
<i>glyA</i>	92.8 (5.5)	42.7	29	31.2	0.07	0.03
<i>tkt</i>	93.6 (6.9)	39.7	29	37.7	0.06	0.07
<i>atpA</i>	94.6 (4.5)	41.9	26	24.4	0.05	0.02
<i>rplA</i>	94.7 (5.2)	41.3	16	27.1	0.05	0.02
<i>dnaK</i>	93.7 (4.5)	39.0	29	26.1	0.06	0.03
<i>pheS</i>	92.7 (5.8)	40.0	32	29.2	0.07	0.02
<i>napA</i>	93.8 (4.8)	37.4	27	25.3	0.06	0.02
<i>metG</i>	92.2 (8.3)	38.2	30	46.2	0.08	0.04
<i>feoB</i>	91.5 (6.6)	36.3	32	34.7	0.09	0.06
<i>gyrB</i>	92.7 (5.7)	36.2	29	32.5	0.07	0.02
<i>valS</i>	92.0 (6.8)	38.7	26	39.6	0.08	0.03

^aAverage nucleotide identity. Standard deviations are in parentheses.

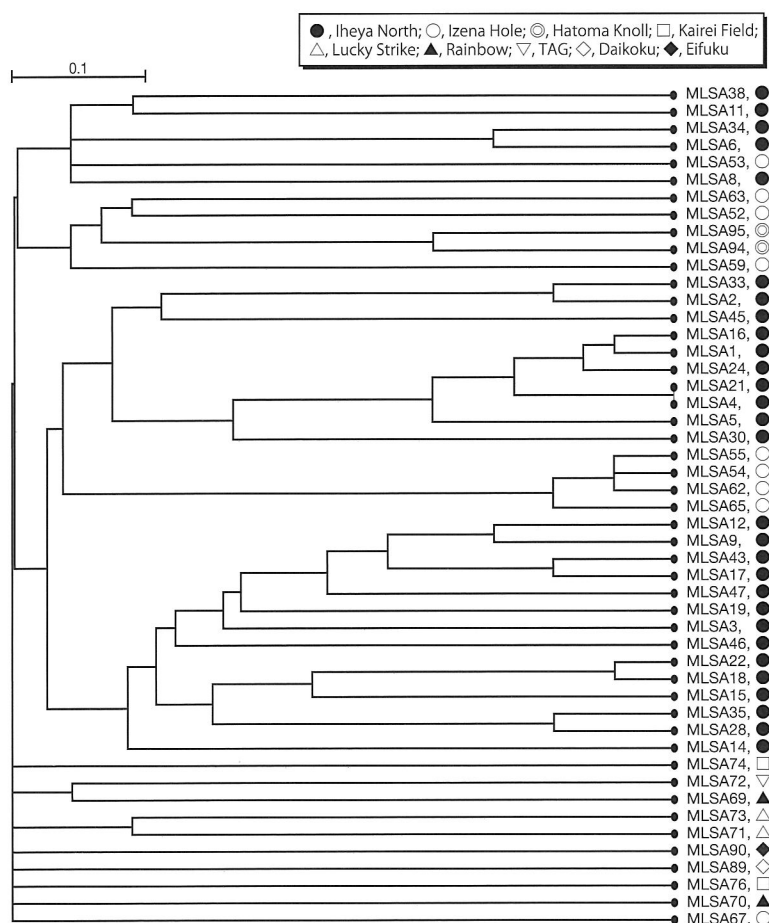


Fig. 2 A UPGMA dendrogram drawn on the basis of the alleles present at each of the 11 loci. Symbols denote origins of isolates.

UPGMA ツリーを作成したところ (Fig. 2), 各分離株は分離源毎に大きなクレードを形成する傾向が認められた。

MLSA 遺伝子の系統と組換え 11種類の MLSA 遺伝子について最尤系統樹を作成し比較したところ, いずれの系統樹間においてもトポロジーが有為異なることが明らかとなった ($P < 0.05$). 加えて, MLSA 遺伝子のうち少なくとも *napA*, *feoB*, *gyrB* の3遺伝子については, RDP ソフトウェアによる解析でも遺伝子組換えが検出された ($P < 0.001$). このうち, *gyrB* 遺伝子について行なったスプリット分解解析の結果を Fig. 3 に示すが, クモの巣状のネットワーク構造が見られ, 組換えが生じていることを示唆している (Fig. 3).

突然変異と組換え 上記の解析において, 分離株群が極めて多様であること, 少なくとも3種類の遺伝子において組換えが生じていることが明らかとなったことから, 分離株において多様性を生じる原動力として, 組換えおよび突然変異の頻度を算出した. その結果, 各遺伝子における組換え頻度/突然変異頻度の値 (ρ/θ) は, 0 から 0.02 の範囲 (平均約 0.003) であり, 本微生物群における多様化の原動力としては突然変異が大きな役割を担っていることが明らかとなった. 海洋性微生物を対象とした同様の解析例は少ないが, 海洋に広く分布している *Alphaproteobacteria* の SAR11 クレードにおいて, 突然変異より組換えの影響が大きいことが示唆されている (Vergin *et al.*, 2007). 算出された値を, MLSA のデータベースが充実している主な病原性微生物のものと比較すると, 深海底熱水活動域に優占する *Epsilonproteobacteria* の突然変異頻度は高く, 同じ *Epsilonproteobacteria* の *Campylobacter* 属と比較的似た群集遺伝学的特徴を有することが明らかとなった (Fig. 4).

生物地理的解析 11種類の MLSA 遺伝子を連結し系統樹を作成したところ, 各分離株は分離毎にクレードを形成する傾向が認められた (Fig. 5). また, 分離源毎の個体群がクローナルであることは, 連鎖不平衡解析においても支持された ($P < 0.01$). さらに, 分離源間の地理的距離と分離株間の遺伝的距離に有為な相関が認められたことから ($P = 0.015$), 各熱水活動域に優占する *Epsilonproteobacteria* 群集は地理的に隔離されていることが明らかとなった. 深海底熱水活動域に棲息する特定の大型生物種において地理的隔離が報告された例は多いが, 世界各地の熱水活動域にはほぼ普遍的に分布する微生物種における多様性を MLSA により評価し地理的分布様式を解明したのは本研究が世界初となった。

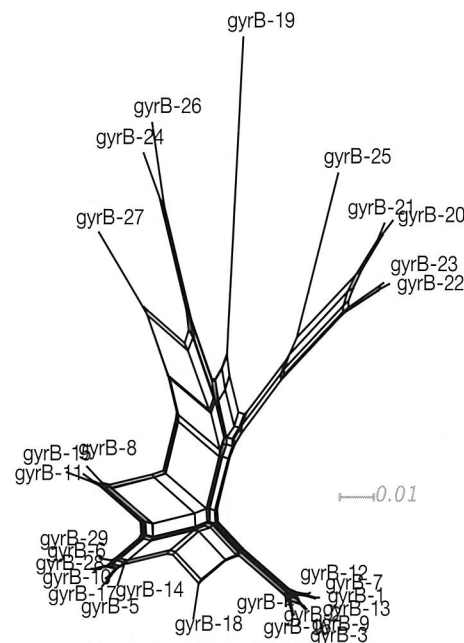


Fig. 3 Example of split decomposition analysis for MLSA loci. Alleles are connected to each other by multiple pathways, forming an interconnected network, is suggestive of recombination.

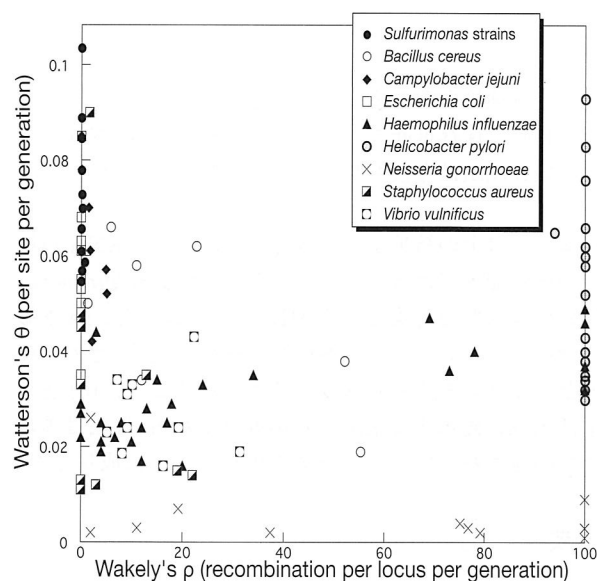


Fig. 4 A scattergram of population recombination rates and population mutation rates. Data for non-deep-sea vent bacteria were obtained from PubMLST.

分離株の保存法 キャピラリー凍結保存法により分離株を保存したところ, これまでのところ (保存期間は最長1年程度) 良好な保存成績 (高い復元率) を得ている. しかしながら, 本研究で用いた分離株の多くは, 培

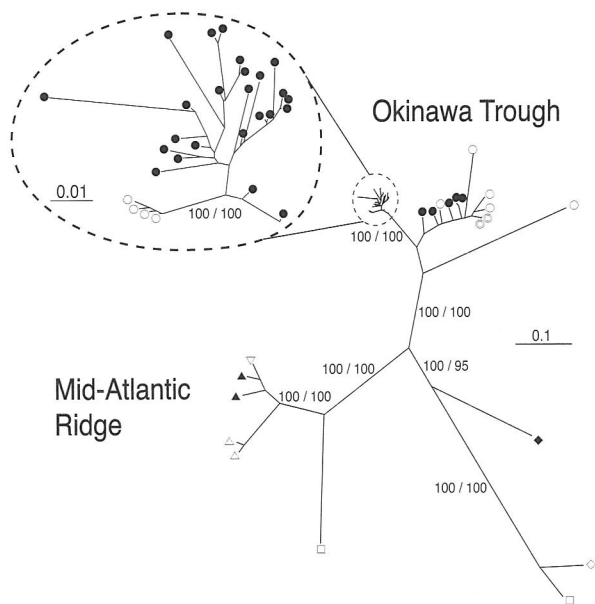


Fig. 5 Maximum likelihood phylogenetic tree constructed from the concatenated sequence of the 11 MLST loci from *Sulfurimonas* strains. Only origins of strains are shown (See Figs 1 and 2 for location). Bootstrap supports using maximum likelihood (left) and maximum parsimony (right) are shown for principal branches.

養した試験管をそのまま低温保存するだけでも、2年程度は良好に保存可能なため、キャピラリー凍結保存法による保存成績は今後も長期的に評価していきたい。

結論 以上の結果より本研究では、i) 16S rRNA 遺伝子の塩基配列では区別できないほど近縁な *Sulfurimonas* 属の分離株群を対象とする MLSA 法を確立し、ii) 本微生物群のゲノムレベルの多様性が極めて高く、その原動力として高い突然変異頻度が考えられること、iii) 各熱水活動域に優占する *Epsilonproteobacteria* 群集は地理的に隔離されていることを突き止めることに成功した。

要 約

化学合成独立栄養性の *Epsilonproteobacteria* は、還元的な硫黄化合物の存在する様々な環境で一次生産者としての役割を担っている。本微生物群はゲノム中に DNA 修復系を欠失しており、群集内の多様性が高いと考えられる。本微生物群の遺伝的多様性をゲノムレベルで評価するため、本研究において多遺伝子座配列解析法を確立した。西太平洋・インド洋・大西洋から分離した 49 株の *Sulfurimonas* 属の分離株について、11 種類のハ

ウスケーピング遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、系統学的に極めて近縁な分離株間において、ゲノムレベルの多様性が極めて高いことが明らかとなり、MLSA 遺伝子あたり平均約 28 種類の対立遺伝子が存在し、各分離株が持つ対立遺伝子の組み合わせは 48 種類存在した。いくつかの遺伝子において遺伝子組換えが検出されたが、進化の原動力としては突然変異と比べると影響力は弱いことが明らかとなった。本研究で決定した全ての MLSA 遺伝子の塩基配列を連結し系統樹を作成したところ、本微生物群集が地理的に隔離されていることが示唆され、連鎖不平衡解析においても統計的に支持された。なお、本微生物群をキャピラリー凍結保存法により液体窒素容器中に保存したところ、良好な保存成績を得ることに成功した。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) Nakagawa, S. (2008). Genome analysis of deep-sea vent epsilon-Proteobacteria. ISSM 2008 Satellite Symposium, 'Environmental genomics'. (Tokyo).

ポスター発表

- 1) Nakagawa, S., Makita, H., Takai, K., Nakamura, K., Godfroy, A. & Horikoshi, K. (2008). Population genetic analysis of deep-sea vent epsilon-Proteobacteria by multilocus sequence typing. International Symposium on Microbial Ecology 12, (Nice).
- 2) 中川聡, 牧田寛子, 高井研, 稲垣史生, 中村光一, Anne Godfroy, 堀越弘毅 (2009). 深海底熱水活動域に優占する化学合成微生物の群集遺伝学的解析, ブルーアース 09, (東京).
- 3) 牧田寛子, 中川聡, 高井研, 中村光一, NT05-18 航海乗船研究者一同 (2009). マリアナ弧北端部の熱水活動域 (日光海山) より単離した新規 Epsilon-Proteobacteria の諸性質, ブルーアース 09, (東京).
- 4) 川市智史, 中川聡, 布浦拓郎, 高井研, 左子芳彦 (2009). 沖縄トラフ深海底熱水孔からの新規好熱性細菌の分離およびその性状解析, ブルーアース 09, (東京).
- 5) 美野さやか, 中川聡, 牧田寛子, 稲垣史生, 山本正浩, 布浦拓郎, 中村光一, Anne Godfroy, 高井研, 澤辺智雄 (2010). 深海底に生息する化学合成微生物の群集遺伝学的構造解明へのアプローチ, 第 26 回日本微生物生態学会大会, (つくば).
- 6) 森直哉, 中川聡, 高井研, Anne Godfroy, 澤辺智雄 (2010). 深海底熱水噴出孔から分離された新規微生物の分類学的・生理学的特徴, 第 26 回日本微生物生態学会大会, (つくば).
- 7) 美野さやか, 中川聡, 牧田寛子, 稲垣史生, 山本正浩, 布浦拓郎, 中村光一, Anne Godfroy, 高井研, 澤辺智雄 (2011). 深海底に生息する化学合成微生物の群集遺伝学的構造解明へのアプローチ, ブルーアース 11, (東京).

保存機関に寄託した菌株

strain IH55 (記載作業中)=NBRC 105219=JCM 15748=KCTC15003
strain 496Chim (記載作業中)=NBRC105224=JCM 15747, DSMZ 保存作業中
strain Matomo55 (記載作業中) JCM 17643=DSM 24660
strain AC55 (記載作業中) JCM 16911=KCTC5961
本稿で述べた *Sulfurimonas* 属の計49株については、NBRC にて寄託手続きを進めている。

謝 辞

本研究に対し、3年間研究助成を頂いた公益財団法人発酵研究所および関係者各位に深く感謝いたします。深海底熱水活動域における試料採取に際しては、支援母船「なつしま」「よこすか」「L'Atalante」の乗組員の皆様、「ハイパードルフィン」「しんかい6500」「Victor」のオペレーションチームの皆様をはじめとする方々の御協力を賜り、深謝申し上げます。

本研究の一部は、独立行政法人海洋研究開発機構の牧田寛子ポスドク研究員および北海道大学の美野さやかさん、京都大学の川市智史君の学生諸子によりなされたものであります。

文 献

- Achtman, M., Azuma, T., Berg, D., Ito, Y., Morelli, G., Pan, Z., Suerbaum, S., Thompson, S., van der Ende, A. & van Doorn, L. (1999). Recombination and clonal groupings within *Helicobacter pylori* from different geographical regions. *Mol. Microbiol.* **32**: 459-470.
- Ambur, O., Davidsen, T., Frye, S., Balasingham, S., Lagesen, K., Rognes, T. & Tønjum, T. (2009). Genome dynamics in major bacterial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 453-470.
- Baldo, L., Dunning Hotopp, J., Jolley, K., Bordenstein, S., Biber, S., Choudhury, R., Hayashi, C., Maiden, M., Tettelin, H. & Werren, J. (2006). Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7098-7110.
- Berkum, P., Elia, P. & Eardly, B. (2006). Multilocus sequence typing as an approach for population analysis of *Medicago-nodulating Rhizobia*. *J. Bacteriol.* **188**: 5570-5577.
- Cary, S., Cottrell, M., Stein, J., Camacho, F. & Desbruyeres, D. (1997). Molecular identification and localization of filamentous symbiotic bacteria associated with the hydrothermal vent annelid *Alvinella pompejana*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1124-1130.
- Coleman, M., Sullivan, M., Martiny, A., Steglich, C., Barry, K., Delong, E. & Chisholm, S. (2006). Genomic islands and the ecology and evolution of *Prochlorococcus*. *Science* **311**: 1768-1770.
- de Las Rivas, B., Marcobal, A. & Muñoz, R. (2004). Allelic diversity and population structure in *Oenococcus oeni* as determined from sequence analysis of housekeeping genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7210-7219.
- Dingle, K., Colles, F., Wareing, D., Ure, R., Fox, A., Bolton, F., Bootsma, H., Willems, R., Urwin, R. & Maiden, M. (2001). Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 14-23.
- Engel, A., Meisinger, D., Porter, M., Payn, R., Schmid, M., Stern, L., Schleifer, K. & Lee, N. (2010). Linking phylogenetic and functional diversity to nutrient spiraling in microbial mats from Lower Kane Cave (USA). *ISME J.* **4**: 98-110.
- Falush, D., Wirth, T., Linz, B. & 15 other authors. (2003). Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* **299**: 1582-1585.
- Gevers, D., Cohan, F., Lawrence, J. & 8 other authors. (2005). Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 733-739.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C. & 51 other authors. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**: 849-852.
- Hurst, L. (2002). The *Ka/Ks* ratio: diagnosing the form of sequence evolution. *Trends Genet.* **18**: 486.
- Inagaki, F., Takai, K., Kobayashi, H., Nealson, K. & Horikoshi, K. (2003). *Sulfurimonas autotrophica* gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing epsilon-proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1801-1805.
- 伊藤隆 (2002). 8. 絶対嫌気性微生物, 今中忠行 (監), 微生物利用の大展開, p. 152-157, エヌ・ティー・エス, 東京.
- Ivars-Martínez, E., D'Auria, G., Rodríguez-Valera, F., Sánchez-Porro, C., Ventosa, A., Joint, I. & Mühling, M. (2008). Biogeography of the ubiquitous marine bacterium *Alteromonas macleodii* determined by multilocus sequence analysis. *Mol. Ecol.* **17**: 4092-4106.
- Labrenz, M., Jost, G., Pohl, C., Beckmann, S., Martens-Habbena, W. & Jürgens, K. (2005). Impact of different in vitro electron donor/acceptor conditions on potential chemolithoautotrophic communities from marine pelagic redoxclines. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 6664-6672.
- Linz, B., Balloux, F., Moodley, Y. & 13 other authors. (2007). An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature* **445**: 915-918.
- Maiden, M. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**: 561-588.
- Maiden, M., Bygraves, J., Feil, E. & 10 other authors (1998). Multilocus sequence typing: a portable

- approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**: 3140-3145.
- Martin, D., Williamson, C. & Posada, D. (2005). RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* **21**: 260-262.
- McVean, G., Awadalla, P. & Fearnhead, P. (2002). A coalescent-based method for detecting and estimating recombination from gene sequences. *Genetics* **160**: 1231-1241.
- Mira, A., Klasson, L. & Andersson, S. (2002). Microbial genome evolution: sources of variability. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 506-512.
- Moyer, C., Dobbs, F. & Karl, D. (1995). Phylogenetic diversity of the bacterial community from a microbial mat at an active, hydrothermal vent system, Loihi Seamount, Hawaii. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1555-1562.
- Nakagawa, S. & Takai, K. (2008). Deep-sea vent chemoautotrophs: diversity, biochemistry and ecological significance. *FEMS Microbiol. Ecol.* **65**: 1-14.
- Nakagawa, S., Takai, K., Inagaki, F., Chiba, H., Ishibashi, J., Kataoka, S., Hirayama, H., Nunoura, T., Horikoshi, K. & Sako, Y. (2005a). Variability in microbial community and venting chemistry in a sediment-hosted backarc hydrothermal system: Impacts of subseafloor phase-separation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **54**: 141-155.
- Nakagawa, S., Takai, K., Inagaki, F., Hirayama, H., Nunoura, T., Horikoshi, K. & Sako, Y. (2005b). Distribution, phylogenetic diversity and physiological characteristics of epsilon-*Proteobacteria* in a deep-sea hydrothermal field. *Environ. Microbiol.* **7**: 1619-1632.
- Nakagawa, S., Takai, K., Inagaki, F., Horikoshi, K. & Sako, Y. (2005c). *Nitratiruptor tergarucus* gen. nov., sp. nov. and *Nitratifactor salsuginis* gen. nov., sp. nov., nitrate-reducing chemolithoautotrophs of the epsilon-*Proteobacteria* isolated from a deep-sea hydrothermal system in the Mid-Okinawa Trough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 925-933.
- Nakagawa, S., Takai, Y., Shimamura, S., Reysenbach, A.-L., Takai, K. & Horikoshi, K. (2007). Deep-sea vent epsilon-proteobacterial genomes provide insights into emergence of pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **104**: 12146-12150.
- Oh, P., Benson, A., Peterson, D., Patil, P., Moriyama, E., Roos, S. & Walter, J. (2010). Diversification of the gut symbiont *Lactobacillus reuteri* as a result of host-driven evolution. *ISME J.* **4**: 377-387.
- On, S. (2001). Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.* **90**: 1S-15S.
- Perna, N., Plunkett, B., V, M. & 25 other authors (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**: 529-533.
- Polz, M. & Cavanaugh, C. (1995). Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**: 7232-7236.
- Reysenbach, A., Longnecker, K. & Kirshtein, J. (2000). Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3798-3806.
- Rocap, G., Larimer, F., Lamerdin, J. & 21 other authors (2003). Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature* **424**: 1042-1047.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J., Messeguer, X. & Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* **19**: 2496-2497.
- Shimodaira, H. & Hasegawa, M. (1999). Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 1114-1116.
- Sievert, S., Scott, K., Klotz, M. & 14 other authors (2008). The genome of the epsilonproteobacterial chemolithoautotroph *Sulfurimonas denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 1145-1156.
- Sikorski, J., Munk, C., Lapidus, A. & 36 other authors (2010). Complete genome sequence of *Sulfurimonas autotrophica* type strain (OK10). *Stand. Genomic Sci.* **3**: 194-202.
- Stamatakis, A., Hoover, P. & Rougemont, J. (2008). A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Syst. Biol.* **57**: 758-771.
- Suzuki, Y., Sasaki, T., Suzuki, M., Nogi, Y., Miwa, T., Takai, K., Nealson, K. & Horikoshi, K. (2005). Novel chemoautotrophic endosymbiosis between a member of the *Epsilonproteobacteria* and the hydrothermal-vent gastropod *Alviniconcha* aff. *hessleri* (Gastropoda: Provannidae) from the Indian Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5440-5450.
- Takai, K., Inagaki, F., Nakagawa, S., Hirayama, H., Nunoura, T., Sako, Y., Nealson, K. & Horikoshi, K. (2003). Isolation and phylogenetic diversity of members of previously uncultivated epsilon-*Proteobacteria* in deep-sea hydrothermal fields. *FEMS Microbiol. Lett.* **218**: 167-174.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596-1599.
- Tatusov, R., Galperin, M., Natale, D. & Koonin, E. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* **28**: 33-36.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882.
- Thompson, J., Pacocha, S., Pharino, C., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D., Benoit, J., Sarma-Rupavtarm, R., Distel, D. & Polz, M. (2005). Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science* **307**: 1311-1313.

- Urakawa, H., Dubilier, N., Fujiwara, Y., Cunningham, D., Kojima, S. & Stahl, D. (2005). Hydrothermal vent gastropods from the same family (*Provannidae*) harbour epsilon- and gamma-proteobacterial endosymbionts. *Environ. Microbiol.* **7**: 750-754.
- Urwin, R. & Maiden, M. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends. Microbiol.* **11**: 479-487.
- Vergin, K., Tripp, H., Wilhelm, L., Denver, D., Rappé, M. & Giovannoni, S. (2007). High intraspecific recombination rate in a native population of *Candidatus Pelagibacter ubique* (SAR11). *Environ. Microbiol.* **9**: 2430-2440.
- Welch, R., Burland, V., Plunkett, R. & 16 other authors (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**: 17020-17024.
- Yakimov, M., La Cono, V., Denaro, R., D'Auria, G., Decembrini, F., Timmis, K., Golyshin, P. & Giuliano, L. (2007). Primary producing prokaryotic communities of brine, interface and seawater above the halocline of deep anoxic lake L'Atalante, Eastern Mediterranean Sea. *ISME J.* **1**: 743-755.

菌類の遺伝子プロモータ領域におけるクロマチン構造の比較に基づく系統分類学研究

西田 洋 巳

東京大学大学院 農学生命科学研究科 アグリバイオインフォマティクス教育研究ユニット
〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

Fungal systematics based on chromatin structure comparison in gene promoters

Hiromi Nishida

Agricultural Bioinformatics Research Unit, Graduate School of Agricultural
and Life Sciences, University of Tokyo
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

Chromatin is the most important structure for maintaining the eukaryotic genomic DNA. The eukaryotic genomic DNA is packaged with histone proteins to form nucleosomes, and nucleosome is the most fundamental repeating unit of chromatin. (1) We performed nucleosome mapping using the filamentous ascomycete *Aspergillus fumigatus*, which was detected at high resolution on the basis of DNA sequence data obtained from the nucleosomal DNA fragments. We found that the distribution of the nucleosomal DNA lengths in the active gene promoters shifted toward shorter lengths than those in the other regions. This suggests that histone modifications and/or histone variants influence nucleosomal DNA length. (2) Based on this finding, we identified nucleosome positions of *A. fumigatus* treated with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA), which induces hyperacetylation of histone proteins. In a comparison of the nucleosome mapping data of the TSA-treated cells and untreated cells, the nucleosomal DNA fragments obtained from the TSA-treated cells were significantly longer than those obtained from the untreated cells, which indicates that TSA influences the nucleosome positions, especially in the regions with high density of nucleosomes, by elongation of the nucleosomal DNA. However, most of the nucleosome positions are conserved in the gene promoters, even after the TSA treatment, because of the low density of nucleosomes in the gene promoters. (3) To elucidate the influence of histone acetylation on nucleosomal DNA length and nucleosome position, we compared nucleosome maps of the following three strains of the ascomycetous yeast *Saccharomyces cerevisiae*: strain BY4741 (control), the histone acetyltransferase gene *ELP3* deletion mutant, and the histone deacetylase gene *HOS2* deletion mutant. We found that the distributions of the nucleosomal DNA lengths of the control and the *HOS2* deletion mutant were similar, while that of the *ELP3* deletion mutant shifted toward shorter than that of the control. This finding strongly suggests that inhibition of Elp3-induced histone acetylation causes nucleosomal DNA length reduction. When we compared the profiles of nucleosome mapping numbers in gene promoters between the control and each of the two gene deletion mutants, we detected 24 genes with low conservation level (correlation coefficient $r < 0.5$) between the control and the *ELP3* deletion mutant as well as between the control and the *HOS2* deletion mutant. Interestingly, in 19 of the 24 genes, the profiles of nucleosome mapping numbers were similar between the two gene deletion mutants. Our findings strongly suggest that the nucleosome position profile in the gene promoter can be used as a marker of fungal systematics. (4) To compare nucleosome maps from a wide range of fungi, we started to determine genome sequences, nucleosome positions, and transcription units of phylogenetically important fungi. We selected the basidiomycete *Mixia osmundae* (authentic strain IAM 14324) and the ascomycetous yeast *Saitoella complicata* as the phylogenetically important fungi. To date, we have deposited 283 contig DNA sequences (13,393,708 bases) of *M. osmundae* and 7981 contig DNA sequences (12,981,880 bases) of *S. complicata* (type strain: NBRC 10748, = IAM 12963) in the international DNA database.

Key words: chromatin, fungal systematics, gene promoter, histone, nucleosome

緒 言

真核細胞生物のゲノム DNA はヒストン 8 量体 (H2A, H2B, H3, H4 各 2 から成る) に 2 回弱巻きつきヌクレオソーム構造をとっている (Luger *et al.*, 1997). このヌクレオソームを最小単位としてクロマチン構造が形成される. ゲノム DNA からの正確な遺伝子発現は生物が生きていく上において必須の要件の一つであり, その制御機構によって細胞のアイデンティティが維持されている. もし, クロマチン構造が閉じた状態にあり, 転写の開始にかかわる制御因子が遺伝子発現調節領域 (プロモータ) に作用できない場合には遺伝子発現は抑制される. すなわち, ヌクレオソームの位置および構造は遺伝子発現制御の基盤となっており, 細胞のアイデンティティの維持に極めて重要である.

近年, DNA シークエンス技術の目覚ましい発展により様々な遺伝学のモデル生物において, ゲノムワイドなヌクレオソームの構造および位置に関する研究が相次いでいる (Dennis *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007; Mavrich *et al.*, 2008; Schones *et al.*, 2008; Segal *et al.*, 2006; Shivaswamy *et al.*, 2008; Valouev *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2005). また, 遺伝子プロモータ領域におけるヒストン修飾が遺伝子発現と関連していることが示されている (Bernstein *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Nishida *et al.*, 2006, 2008; Roh *et al.*, 2005).

菌類におけるクロマチン構造研究は, 子囊菌出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* および分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* にほぼ限られている. さらに, これらの酵母におけるヌクレオソームの形成および位置に関する違いについて報告されている (Lantermann *et al.*, 2010). 最近, 子囊菌酵母に属する複数の種におけるヌクレオソーム構造の比較研究が行われ, その位置取りの差異が示された (Tsankov *et al.*, 2010). しかし, 糸状菌についてはゲノムワイドなヌクレオソームマップのデータが存在していない. 子囊菌 (類) 以外の菌類 (担子菌類, 接合菌類, ツボカビ類) に関するヌクレオソーム研究は著者の知る限り皆無であり, ヌクレオソームの構造および位置が菌類においてど

のような生物学的意義を持っているか不明である. そこで, 本研究において, 糸状菌として世界にさきがけ *Aspergillus fumigatus* のゲノムワイドなヌクレオソームマップを作成し, その特徴を明らかにし, さらにヒストンアセチル化がヌクレオソームの構造および位置に与える影響について *A. fumigatus* および *S. cerevisiae* を用いて明らかにする.

A. fumigatus および *S. cerevisiae* のヌクレオソームに関する基礎的なデータを整理した上で, 菌類系統分類学上極めて重要な *Mixia osmundae* および *Saitoella complicata* のゲノム塩基配列の決定およびヌクレオソームマップの研究を展開する. *M. osmundae* はその発見より 80 年あまりにわたり子囊菌類に分類されていたが, そのリボソーム RNA の塩基配列比較および微細形態的特徴より担子菌類に再分類された (Nishida *et al.*, 1995, 2011). 電子顕微鏡観察より, 今までに報告がないタイプの担子胞子形成を行っていると考えられている (Bauer *et al.*, 2006; Nishida *et al.*, 1995, 2011). しかし, 担子菌類内での *M. osmundae* の系統進化的位置については不明のままであり, 担子菌類の進化を考える上で極めて重要な菌類である. *S. complicata* はヒマラヤ土壤から分離されたアナモルフ酵母であり (Goto *et al.*, 1987), そのリボソーム RNA の塩基配列比較より子囊菌類の Taphrinomycotina に分類されているが (Nishida & Sugiyama, 1993), Taphrinomycotina 内における系統進化的位置については不明であり, 類似菌類の報告が全くなく, 子囊菌類の進化を考える上で極めて重要な菌類である.

本研究の目的は, 菌類の遺伝子プロモータ領域におけるヌクレオソームの構造および位置の情報を比較する方法を確立し, 菌類進化学および菌類系統分類学に適用することである.

実験方法

菌類におけるヒストン修飾関連タンパク質の進化的保存度の比較 遺伝子注釈付けが最も進んでいる *S. cerevisiae* および *Schizosaccharomyces pombe* のゲノム情報を用いて, 菌類におけるヒストン修飾関連タンパク質の進化的保存度について網羅的に解析した. *S. cerevisiae* は 62 のヒストン修飾関連タンパク質 (*Saccharomyces* Genome Database, <http://www.yeastgenome.org/>), また *Schizosaccharomyces pombe* は 48 のヒストン修飾関連タンパク質 (*Schizosaccharomyces pombe* GeneDB, <http://www.genedb.org/genedb/pombe/>)

E-mail: hnishida@iu.a.u-tokyo.ac.jp

共同研究者: 本山高幸 (理化学研究所), 長田裕之 (理化学研究所), 鈴木稔 (東京大学新領域創成科学研究科), 油谷浩幸 (東京大学先端科学技術研究センター), 山本尚吾 (東京大学先端科学技術研究センター), 松本貴嗣 (東京農業大学), 吉川博文 (東京農業大学), 杉山純多 (テクノスルガ・ラボ), 浜本牧子 (明治大学)

を持っている。これら 110 のタンパク質をクエリー配列として、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) データベースにおいて6種の子囊菌類 (*A. fumigatus*, *Kluyveromyces lactis*, *Neurospora crassa*, *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*), 2 種の担子菌類 (*Cryptococcus neoformans*, *Ustilago maydis*), および微胞子虫 *Encephalitozoon cuniculi* の全タンパク質に対して BLASTP 検索を行った。

***Aspergillus fumigatus* のヌクレオソームマップ解析**
A. fumigatus Af293 株の分生子 2×10^8 個を 20 ml の PD 培地 (2.4% potato dextrose) で 28 度, 24 時間培養し, Micrococcal Nuclease (MNase) 5 U/mg の濃度で 37 度, 15 分間反応させ, その後, アガロースゲル電気泳動を行い, 単一および単二ヌクレオソーム DNA 断片をゲルより切り出し, 精製した。それらの DNA 断片を Illumina Genome Analyzer により, その両端塩基配列を各 36 塩基決定した。それにより得られた塩基配列に対し ELAND を用いて, *A. fumigatus* ゲノム (NC_007194 から NC_007201 の 8 本の染色体) にマップした。方法の概略を Fig. 1 に示す。なお, 遺伝子発現については, Roche NimbleGen Systems を用いたカスタマイズマイクロアレイにより 9887 遺伝子について検出し, 転写開始点についてはオリゴキャップ法 (Suzuki & Sugano, 2003) により, RNA の 5' 末端塩基配列 34 塩基を Illumina Genome Analyzer を用いて決定し, ゲノムにマップした。

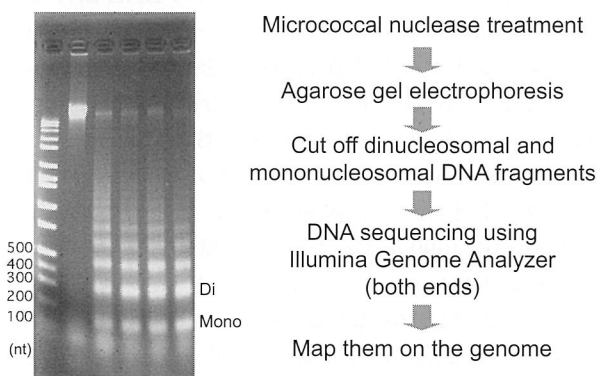


Fig. 1 Nucleosome mapping method. 1st lane from left side in agarose gel electrophoresis, DNA size marker. 2nd, *Aspergillus fumigatus* chromatin without MNase treatment. 3rd-6th, MNase-treated chromatin. Di, dinucleosomal DNA fragment. Mono, mononucleosomal DNA fragment.

トリコスタチン A 処理の *Aspergillus fumigatus* のヌクレオソームマップ解析
A. fumigatus を 28 度, 24 時間培養時にトリコスタチン A (TSA) を $1 \mu\text{M}$ の濃度で添加した。また, MNase 処理の時間による違いを調べるため, その反応時間を 15 分間および 30 分間行ったもの 2 系列を用意した。TSA 処理の細胞からのヌクレオソームマップにおいては, 単一および単二ヌクレオソーム DNA 断片の両端各 76 塩基配列を決定し, それらをマップした。遺伝子発現については, Roche NimbleGen Systems を用いたカスタマイズマイクロアレイにより 9887 遺伝子について検出した。

***Saccharomyces cerevisiae* のヌクレオソームマップ解析**
S. cerevisiae EUROSCARF Y00000 株 (BY4741), Y02742 株 (ヒストンアセチル化酵素遺伝子 *ELP3* 欠失株), および Y04561 株 (ヒストン脱アセチル化酵素遺伝子 *HOS2* 欠失株) を用いた。*S. cerevisiae* は YPD 培地において 30 度, 一晚培養し, 600 nm で濁度 0.1/ml になるように希釈し, 0.8/ml になるまで 30 度で培養した。Zymolyase を 0.25 mg/ml の濃度で 30 度, 30 分間処理し, スフェロプラスト化した。その後, MNase を 0.75 U/350 μl の濃度で 37 度, 30 分間反応させた。単一ヌクレオソーム DNA 断片を Illumina Genome Analyzer II を用いて両端各 91 塩基配列を決定した。Burrows-Wheeler Aligner を用いて *S. cerevisiae* ゲノム (NC_001133 から NC_001148 の 16 本の染色体) にマップした。

***Mixia osmundae* および *Saitoella complicata* のゲノムシーケンズ解析**
M. osmundae IAM 14324 (=JCM 22182) 確実な株 (authentic strain) および *S. complicata* NBRC 10748 (=IAM 12963) 基準株を使用した。*M. osmundae* については, YM 培地で 25 度, 6 日間培養後, PBS 緩衝液 (pH 7.4) で 3 回洗浄した。 5×10^8 細胞より QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。*S. complicata* については, YM 培地で 25 度, 3 日間培養後, TE 緩衝液 (pH 8.0) で 3 回洗浄した。 7×10^8 細胞より QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。双方とも, ゲノム DNA シーケンズは Roche GS FLX Titanium を用いて行った。得られたコンティグの類似性検索は BLASTX を用いて, そこにコードされているタンパク質のアミノ酸配列 (断片) とデータベースに登録されているタンパク質との類似性を調べた。

結 果

菌類におけるヒストン修飾関連タンパク質の進化的保存度の比較 *S. cerevisiae* および *Schizosaccharomyces pombe* のヒストン修飾関連タンパク質の進化的保存度の比較より、ヒストンアセチル化および脱アセチル化に関与するタンパク質複合体における活性タンパク質の進化的保存度はアクセサリタンパク質よりも高いにもかかわらず、ヒストンメチル化に関与するタンパク質複合体においてはアクセサリタンパク質の方が活性タンパク質よりも高いことを示した (原著論文1)。また、ヒストンアセチル化酵素 Elp3 が最も進化的に保存されていることを明らかにした (原著論文1)。

Aspergillus fumigatus のヌクレオソームマップ解析 全ゲノム領域にわたる糸状菌のヌクレオソームマップは *A. fumigatus* Af293 株が初めての報告となった (原著論文2)。ヌクレオソーム DNA の長さが単一ヌクレオソームにおいて 236 塩基以上および単二ヌクレオソームにおいて 436 塩基以上にわたりマップされたものは除き、単一ヌクレオソーム 7715001, 単二ヌクレオソーム 8565279 の DNA 断片をゲノム上にマップし、単一ヌクレオソーム位置 5975567, 単二ヌクレオソーム位置 6995122 を明らかにした (原著論文2)。ヌクレオソーム DNA の長さの分布を調べたところ、単一ヌクレオソームでは 135 および 150 塩基長の 2 つのピーク、単二ヌクレオソームでは 285 塩基長の 1 つのピークがあった。

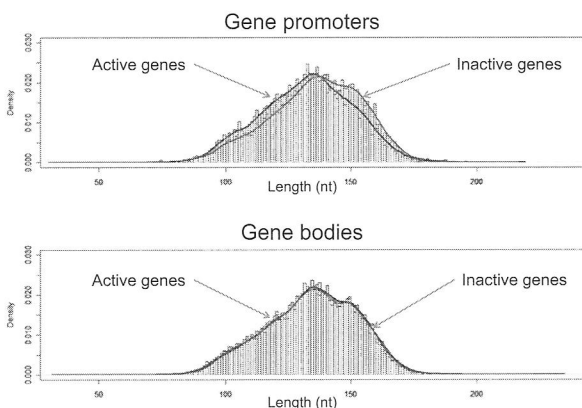


Fig. 2 Histograms of nucleosomal DNA fragment lengths in promoters and bodies of transcriptionally active and inactive genes. The active protein-coding genes (from the highest to the 50th highest) and the inactive genes (from the lowest to the 50th lowest) were extracted on the basis of the microarray data.

9887 遺伝子に関するマイクロアレイ解析の結果に基づき、高発現遺伝子群 (発現レベルの最も高いものから 50 遺伝子) および低発現遺伝子群 (発現レベルの最も低いものから 50 遺伝子) に分け、それぞれの遺伝子群における遺伝子プロモータ領域 (本研究では翻訳開始からその上流 1 kb の領域とした) と遺伝子ボディ領域 (翻訳開始から終結まで) のヌクレオソーム DNA 長の分布を調べた。その結果、高発現遺伝子群ボディ領域、低発現遺伝子群プロモータおよびボディ領域における単一ヌクレオソームの長さの分布は全体のものとは違いがなく、高発現遺伝子群プロモータ領域においてのみ 150 塩基長のピークが欠落し、135 塩基長のピークのみとなり、全体が短い方へシフトしていた (Fig. 2)。なお、単二ヌクレオソームの長さの分布についてはこれら 4 つの領域における差は認められなかった (原著論文2)。単一および単二ヌクレオソームのマップ数の比から領域毎の MNase 感受性を評価する方法を開発し、それを適用したところ、転写活性の高い遺伝子においてはプロモータ領域の MNase 感受性が翻訳領域よりも高くなっていることを示した (原著論文3)。

トリコスタチン A 処理の *Aspergillus fumigatus* のヌクレオソームマップ解析 ヒストンアセチル化がヌクレオソームに与える影響を調べるため、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) を処理した細胞 (ヒストンアセチル化レベルがゲノム全体にわたりに上がっている) を用いて、同様にヌクレオソームの位置を決定した (原著論文4)。MNase の処理時間 15 分間の細胞については、単一ヌクレオソーム 9487154 および単二ヌクレオソーム 9197430 の DNA 断片をゲノム上にマップし、単一ヌクレオソーム位置 7178492, 単二ヌクレオソーム位置 7199013 を明らかにした (原著論文4)。MNase の処理時間 30 分間の細胞については、単一ヌクレオソーム 11086845 および単二ヌクレオソーム 14382898 の DNA 断片をゲノム上にマップし、単一ヌクレオソーム位置 8932331, 単二ヌクレオソーム位置 11674690 を明らかにした (原著論文4)。ヌクレオソーム DNA の長さの分布を調べたところ、単一ヌクレオソームでは 168 塩基長 (MNase 15 分間処理), 160 塩基長 (MNase 30 分間処理), 単二では 321 塩基長 (MNase 15 分間処理), 306 塩基長 (MNase 30 分間処理) のそれぞれ 1 つのピークがあった (Fig. 3)。

TSA 処理による遺伝子発現変動を 9887 遺伝子について調べた結果、コントロールと TSA 処理では発現レベルの相関係数 $r = 0.95$ と極めて高い結果であった (Fig. 4)。発現レベルが 2 倍以上に増加した遺伝子は 28, 半分以下に低下した遺伝子は 49 であった (原著論文4)。そこ

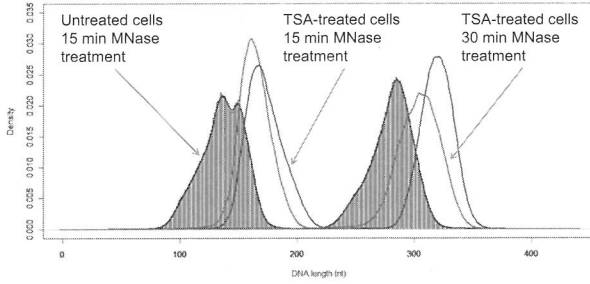


Fig. 3 Histograms of mononucleosomal and dinucleosomal DNA fragment lengths from trichostatin A-treated cells and untreated cells of *Aspergillus fumigatus*.

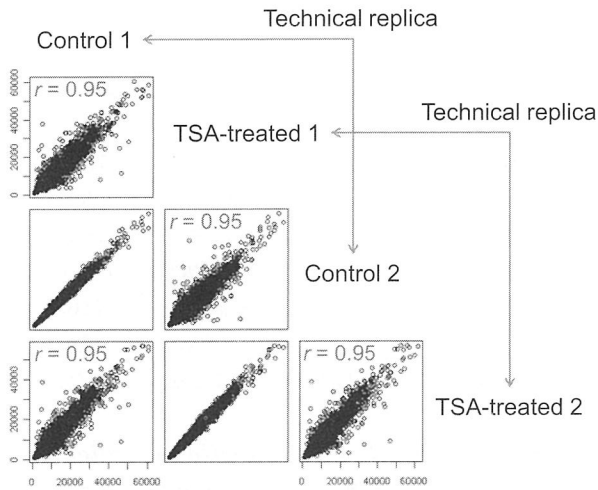


Fig. 4 Scatter plots of expression levels of 9887 genes between trichostatin A-treated and untreated cells of *Aspergillus fumigatus*.

で、これら発現レベルに変化が見られた遺伝子と変化が見られない遺伝子において、そのヌクレオソームの位置を比較した。マップされたヌクレオソーム DNA 断片に基づき、その位置のプロファイル (Fig. 5A) を比較し、ヌクレオソーム位置の保存度をピアソン積率相関係数で評価した。その結果、発現レベルの変化によらず、多くの遺伝子において遺伝子プロモータ領域におけるヌクレオソーム位置の保存度が遺伝子ボディ領域よりも高かった (Fig. 5B)。

TSA を処理していないコントロールにおける転写開始点解析により、1000以上のタグ数を持った位置は557存在していた(原著論文4)。それらの転写開始点の上流300塩基および下流300塩基の領域におけるヌクレオソーム位置の保存度を比較したところ大きな差異は認められなかった (Figure S1 in 原著論文4)。

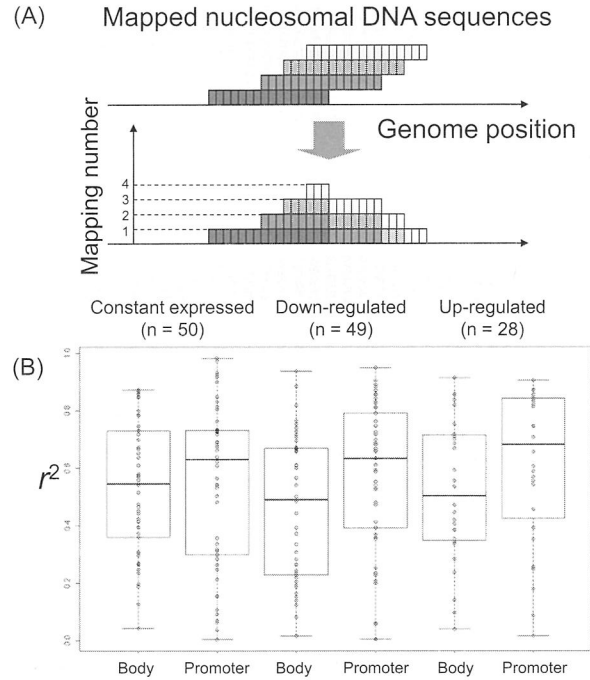


Fig. 5 (A) An example of mapping numbers for each nucleotide position. (B) Boxplots of squares of Pearson's correlation coefficients between profiles of trichostatin A-treated and untreated nucleosome mapping numbers in 50 constantly expressed genes, 49 down-regulated (< 50% expression level) genes, and 28 up-regulated (> 200% expression level) genes.

***Saccharomyces cerevisiae* のヌクレオソームマップ解析** *S. cerevisiae* の62のヒストン修飾関連タンパク質の菌類における保存度をランキングしたところ(原著論文1)、ヒストンアセチル化酵素 Elp3 が最も保存度が高いことが分かった (Fig. 6)。そこで、*ELP3* およびヒストン脱アセチル化酵素遺伝子 *HOS2* (保存度ランキング第3位) 欠失変異株において、ヌクレオソームマップを行った。その結果、BY4741株(コントロール)、*ELP3* 欠失株、*HOS2* 欠失株において、単一ヌクレオソーム1578348, 789257, 2664981のDNA断片をゲノム上にマップし、単一ヌクレオソーム位置1522676, 771069, 2427330を明らかにした(原著論文6)。ヌクレオソームDNAの長さの分布を調べたところ、BY4741株(コントロール)、*ELP3* 欠失株、*HOS2* 欠失株において、163塩基長、160塩基長、162塩基長の主要なピークがあった (Fig. 7A)。

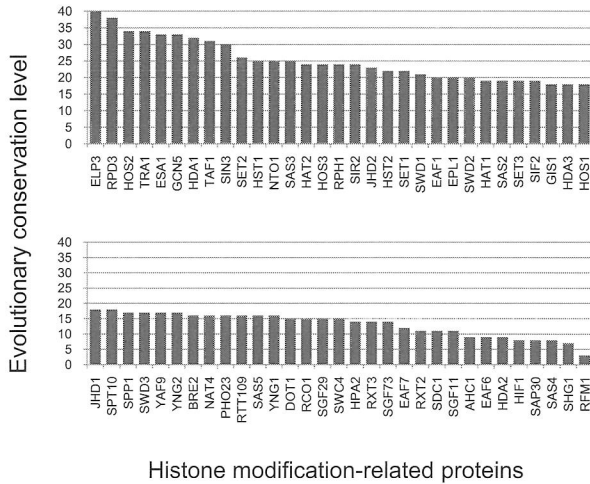


Fig. 6 Evolutionary conservation levels of *Saccharomyces cerevisiae* proteins related to histone modification.

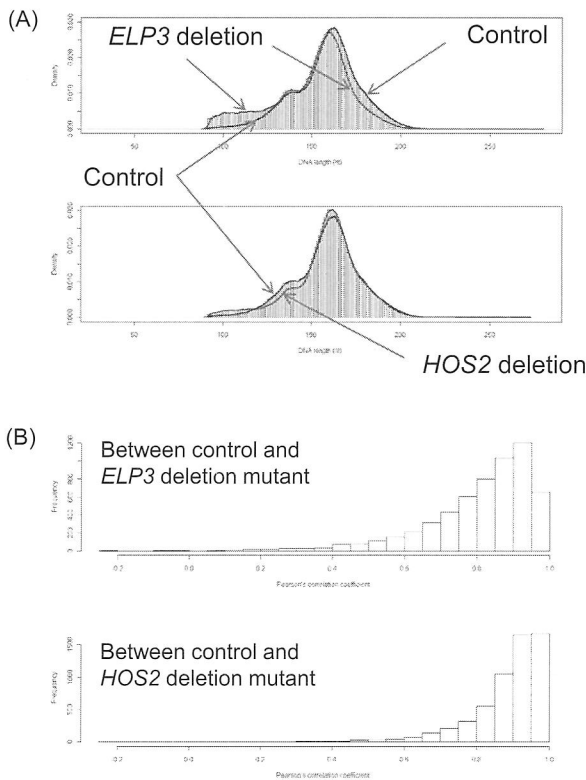


Fig. 7 (A) Histograms of nucleosomal DNA lengths of *Saccharomyces cerevisiae* (BY4741, *ELP3* deletion mutant, and *HOS2* deletion mutant). (B) Histograms of Pearson's correlation coefficients between profiles of control and each gene deletion mutant mapping numbers in promoters of 5869 protein-coding genes.

マップされたヌクレオソーム DNA 断片に基づき、その位置のプロファイルと比較し、ヌクレオソーム位置の保存度をピアソン積率相関係数で示したところ、*S. cerevisiae* の5869タンパク質コード遺伝子プロモータにおいて、コントロール株と *ELP3* 欠失株間の方がコントロール株と *HOS2* 欠失株間よりも保存度が低い遺伝子が多く存在していた (Fig. 7B). 相関係数が0.5未満であった遺伝子がコントロール株と *ELP3* 欠失株間では283, コントロール株と *HOS2* 欠失株間では53存在し、その中24遺伝子は共通であった (原著論文6). 興味深いことにこれら24遺伝子の中、19遺伝子については2つの遺伝子欠失株間におけるヌクレオソーム位置の保存度が高かった (Table 1).

ELP3 欠失株のヌクレオソームマップ数がコントロール株および *HOS2* 欠失株のそれらに比べ少なかったため、さらにリード数を増やし先の結果と合計して3136450のヌクレオソームをマップし2892273のヌクレオソーム位置を決定した. そのヌクレオソーム長の分布において160塩基の主要ピークに変化はなかったが、コントロールとのヌクレオソーム位置のプロファイルの比較において相関係数が0.5未満である数は63になった. また、分布の様子は *HOS2* のそれよりも低い方へ偏っていることに変化はなかったことを確認した.

Mixia osmundae および *Saitoella complicata* のゲノムシーケンス解析 *M. osmundae* IAM 14324株のドラフトゲノム DNA 断片のシーケンスは二度行った. 一度目の結果、4408コンティグ DNA 配列 (3,019,501塩基) を明らかにし、BABT01000001~01004408のアクセス番号で国際的 DNA データベースに登録し、公開した. また、これら4408のコンティグ DNA 塩基配列をクエリーとしてBLASTXによる類似配列検索を行った結果、 E 値 $< 10^{-20}$ でヒットした配列は1473塩基配列存在し、そのトップヒット配列を有する生物の属名をまとめたところ、最も多くヒットした菌類は Ustilaginomycotina に属する *Ustilago* の340、次に多くヒットした菌類は Agaricomycotina に属する *Laccaria* の239 遺伝子産物であった (原著論文5). ゲノム塩基配列の断片をより多く結合させるため、さらに塩基配列の決定を行い (二度目のシーケンス解析)、一度目と二度目を合わせた結果、283コンティグ DNA 配列 (13,393,708塩基) となり、BABT02000001~02000283のアクセス番号で登録した.

Saitoella complicata NBRC 10748株のドラフトゲノム DNA 断片のシーケンスにより、7981コンティグ DNA 配列 (12,981,880塩基) を明らかにし、BACD01000001~01007981のアクセス番号で

菌類の遺伝子プロモータ領域におけるクロマチン構造の比較に基づく系統分類学研究

Table 1 Genes with low conservation level of nucleosome positions in promoters

Chromosome	Correlation coefficient between control and <i>ELP3</i> deletion	Correlation coefficient between control and <i>HOS2</i> deletion	Correlation coefficient between <i>ELP3</i> and <i>HOS2</i> deletions	Translational start site	Transcription direction	Locus tag	Gene name	Function
2	0.249607174	0.473673107	0.7721589	235795	-	YBL003C	HTA2	histone H2A
2	0.348375767	0.456574762	0.925312	236495	+	YBL002W	HTB2	histone H2B
2	0.167687998	0.498226441	0.4466425	275527	-	YBR018C	GAL7	galactose-1-phosphate uridyl transferase
2	0.236843537	0.48510247	0.7772281	332829	+	YBR048W	RPS11B	component of the small ribosomal subunit
3	-0.016805523	0.487126621	0.4006219	301296	-	YCR099C		unknown
4	0.085009851	0.232139365	0.7189923	1252529	+	YDR389W	SAC7	GTPase activating protein for Rho1
4	0.152408275	0.28069126	0.5575123	1456686	-	YDR504C	SPG3	protein required for survival at high temperature during stationary phase
4	0.055918124	0.486328976	0.5588501	1490588	+	YDR525W-A	SNA2	unknown
5	0.443413247	0.410937945	0.8950202	559449	+	YER185W	PUG1	plasma membrane protein involved in protoporphyrin uptake
6	0.408998973	0.400870707	0.04896357	74425	-	YFL033C	RIM15	glucose-repressible protein kinase
7	0.11172062	0.206927302	0.7238332	915246	+	YGR211W	ZPR1	essential protein with two zinc fingers
8	0.151686283	0.223618366	0.8327685	127774	+	YHR011W	DIA4	probable mitochondrial seryl-tRNA synthetase
9	0.422569353	0.446417635	0.6548925	257061	-	YIL052C	RPL34B	component of the large ribosomal subunit
12	0.194538514	0.490307343	0.8172198	88622	+	YLL026W	HSP104	heat shock protein that cooperates with Ydj1p and Ssa1p
12	0.380423431	0.303213268	0.847854	1014175	-	YLR438C-A	LSM3	U6 snRNA-associated Sm-like protein
12	0.07769072	0.340055324	0.7438567	1066570	+	YLR464W		unknown
13	0.38055936	0.496357301	0.5092175	335297	+	YMR032W	HOF1	domain-containing protein required for cytokinesis
13	0.101118688	0.483732376	0.8159712	475452	-	YMR104C	YPK2	protein kinase
14	0.169243455	0.31430664	0.1470152	8330	+	YNL336W	COS1	unknown
14	0.418800862	0.472949337	0.6864377	137700	+	YNL269W	BSC4	unknown
14	0.390506697	0.450747268	0.07042813	745343	-	YNR062C		putative membrane protein
15	0.470409741	0.453495316	0.5922247	586982	+	YOR140W	SFL1	transcriptional repressor and activator
15	0.41110728	0.408744637	0.738176	817291	+	YOR262W		unknown
15	0.188881962	0.356846187	0.8161629	1007219	+	YOR356W		mitochondrial protein with similarity to flavoprotein-type oxidoreductases

国際的 DNA データベースに登録し、公開した。また、これら7981のコンティグ DNA 塩基配列をクエリーとして BLASTX による類似配列検索を行った結果、 E 値 $< 10^{-5}$ でヒットした配列は5789塩基配列存在し、そのトッ

ピット配列を有する生物群をまとめたところ、3743 (64.7%) が Pezizomycotina, 616 (10.6%) が Saccharomycotina, 673 (11.6%) が Taphrinomycotina, 755 (13%) が Basidiomycotaであった (原著論文9)。

考 察

同じ機能を持つタンパク質や RNA の構造は異なる生物間においても保存されていることが多く、その配列の類似性に基づく比較生物学が展開している。他方、その遺伝子発現を制御している領域(遺伝子プロモータ領域)については特定の転写因子の結合コンセンサス配列がマップされるなどの研究が発表されているが、ある程度の長さを持って DNA 塩基配列が保存されていることは極めて稀である。よって、異なる生物間における遺伝子プロモータ領域の塩基配列比較に基づく系統進化解析を行うことは困難であるかあるいはできない。構造遺伝子の細胞内における機能が進化的に保存されてきたことを考えると、その遺伝子発現制御機構もある程度保存されていると考えられるため、遺伝子プロモータ領域では DNA 塩基配列とは異なる比較尺度が存在していると予測される。本研究で得られた成果の一つとして、遺伝子プロモータ領域におけるヌクレオソームの位置を異なる遺伝子および異なる生物種間で比較する方法を確立したことが挙げられ、遺伝子プロモータ領域の比較における一つの尺度としてここに提案する。

本研究では培養した多くの細胞由来のヌクレオソーム DNA のシーケンスに基づきヌクレオソームの位置を決定した。よって、ヌクレオソームの位置が多くの細胞で共通である(保存されている)領域、細胞により多様性がありヌクレオソームの位置がはっきりしていない領域を区別することができる。また、遺伝子プロモータ領域におけるヌクレオソーム位置の保存度は遺伝子ボディ領域(翻訳開始より終結までの領域)よりも高く、プロモータ領域におけるヌクレオソームの位置が遺伝子発現に影響を与えることを強く示唆している。また、ヌクレオソームの位置の保存度を指標としてプロモータ領域の抽出が可能であることを強く示唆している。

A. fumigatus におけるヌクレオソーム DNA の長さの分布をでは、135 塩基と 150 塩基の 2 つのピークが存在し、遺伝子発現レベルが高いプロモータ領域においてのみ、150 塩基のピークが欠落し、分布が短い方へシフトしていることが分かった (Fig. 2)。このことより、遺伝子の高発現のためにはヌクレオソーム DNA が長く巻きついているヌクレオソームが阻害的に作用することが示唆された。そこでヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である TSA を *A. fumigatus* 細胞に処理することにより、ヒストンのアセチル化レベルをゲノムワイドに高い状態にしたものを準備し、そのヌクレオソームマップを行った。その結果、TSA 処理によりヌクレオソーム DNA が伸長していることが分かり (Fig. 3)、ヌクレオ

ソーム DNA の伸長とヒストンアセチル化が関係していることを確認した。

しかし、ヌクレオソーム DNA の伸長による遺伝子発現への影響が極めて小さい結果(約 10000 遺伝子の中、2 倍以上の発現レベルの変化があったものが 29、半分以下の発現レベルの変化があったものが 48、原著論文 4)であったことより (Fig. 4)、TSA を処理していないコントロールにおける高発現遺伝子プロモータ領域におけるヌクレオソーム DNA 長の短い方へのシフトと TSA 処理におけるヌクレオソーム DNA の伸長とは異なる現象であると考えられる。そこで、TSA を処理した細胞としていない細胞におけるヌクレオソーム位置の保存性に焦点を当て遺伝子プロモータ領域とボディ領域について比較したところ、遺伝子プロモータ領域の保存度が遺伝子発現レベルにかかわらず遺伝子ボディ領域よりも高いことを明らかにした (Fig. 5B)。この結果は、TSA による過剰ヒストンアセチル化の影響が遺伝子ボディ領域のヌクレオソームの位置の変化には大きな影響を与えたが、プロモータ領域ではそれほどではなかったことを意味しており、遺伝子ボディ領域におけるヌクレオソームに位置の変化はほとんどの遺伝子発現には影響を与えなかったことを示唆している。遺伝子プロモータ領域のヌクレオソーム密度が遺伝子ボディ領域よりも低いため、ヌクレオソーム DNA の伸長の影響がより少なかったと考えている (Fig. 8)。

ヒストンおよびヒストン修飾に関連している遺伝子について TSA 処理における発現レベルの変動を見たところ、ヒストン脱アセチル化酵素の一つをコードしている *rpda* (*Afu2g03390*) の発現レベルが最も高い変動をしていることが分かった (Fig. 9)。この結果は、*Aspergillus nidulans* における TSA 処理の結果 (Tribus *et al.*, 2010) と一致しており、本実験において

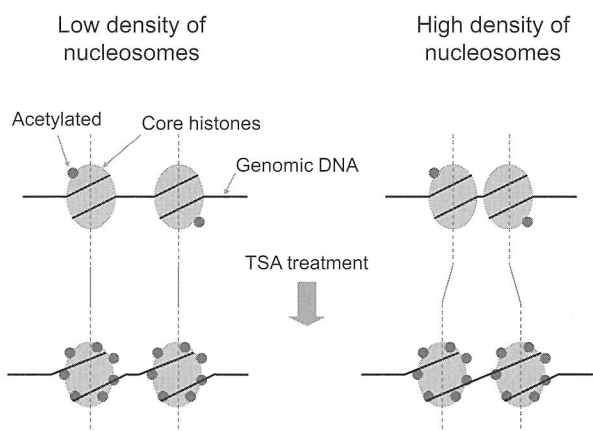


Fig. 8 Model of influence of histone acetylation on nucleosome position.

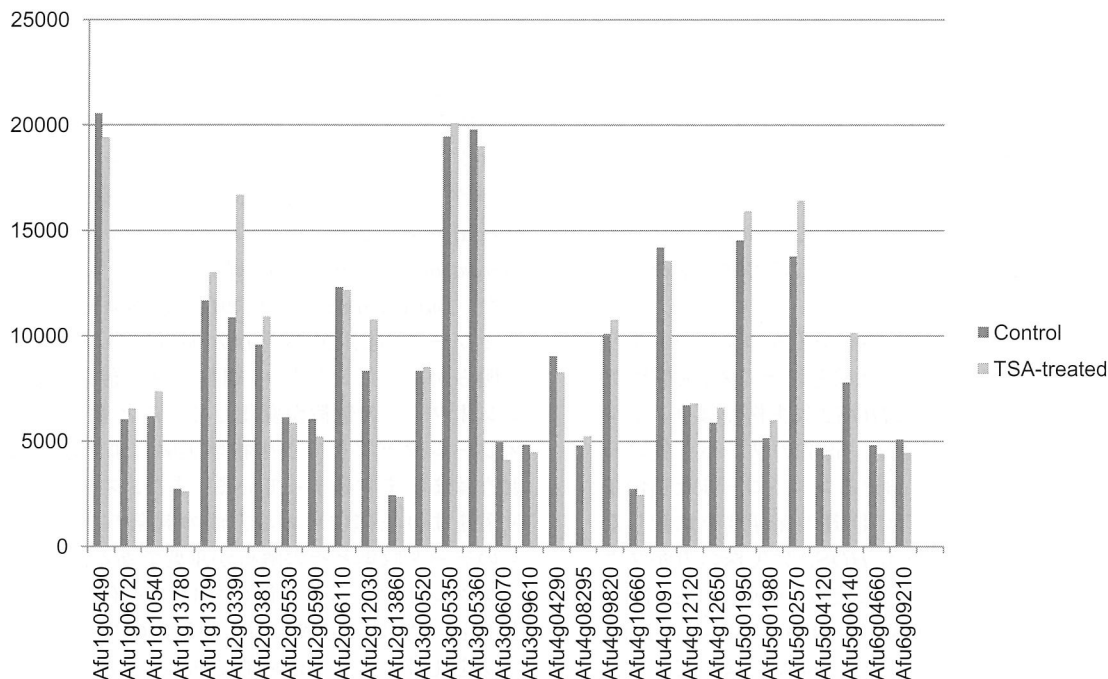


Fig. 9 Expression levels of histone-related genes of trichostation A-treated and untreated cells of *Aspergillus fumigatus*. x-axis, gene name. y-axis, expression level.

も TSA が細胞に作用したことを意味している。そこで、*rpdA* の周辺におけるヌクレオソームマップの比較をコントロールと TSA 処理において行った。また、コントロールにおける転写開始点データを重ねて見たところ、転写開始点の一つのヌクレオソームの周辺に分布していること、その上流にもう一つのヌクレオソームが位置していること、TSA 処理によってこれら 2 つのヌクレオソームの数が激減している（特に転写開始点に近接しているヌクレオソームについて）ことが分かった (Fig. 10)。この結果は、TSA の影響により、これら 2 つのヌクレオソームが多く細胞において形成されなかったことを示し、その影響で遺伝子発現レベルが上昇したと考えられる。ヒストンアセチル化とコアヒストンの離脱の関係解明にはより詳細な実験が必要であるが、転写開始点付近のコアヒストンが本遺伝子発現に対し抑制的に機能している可能性が高い。

S. cerevisiae および *Schizosaccharomyces pombe* のヒストン修飾関連のタンパク質複合体を形成しているタンパク質の菌類における進化的保存度の比較より、ヒストンアセチル化とメチル化ではその進化の過程が異なっていることを示唆する結果を得た (原著論文 1)。本研究では、ヒストンアセチル化・脱アセチル化にかかわる修飾活性タンパク質に焦点を絞り解析を行った。ヒストンアセチル化とヌクレオソームの位置に関する関係をより深く解析するため、*S. cerevisiae* のヒストンアセ

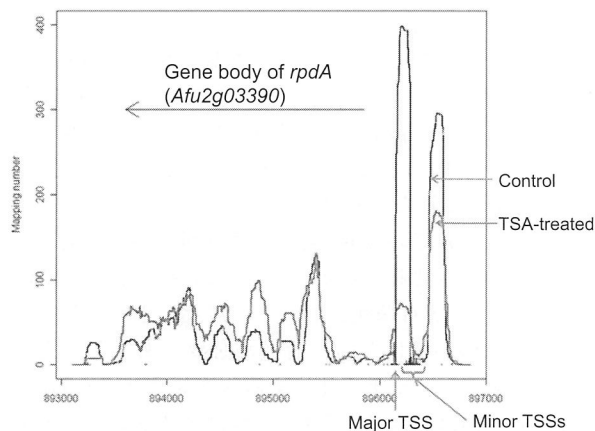


Fig. 10 Mapping numbers of nucleosomes and transcription start sites around the histone deacetylase gene *rpdA* of *Aspergillus fumigatus*. x-axis, nucleotide position on chromosome 2.

チル化および脱アセチル化酵素遺伝子欠失変異株を用いてヌクレオソームマップを行った。

最も進化的保存度が高いヒストンアセチル化酵素遺伝子 *ELP3* 欠失株および進化的保存度が 3 番目に高いヒストン脱アセチル化酵素遺伝子 *HOS2* 欠失株の遺伝子欠失はそれらの構造遺伝子領域にヌクレオソームがマップされていないことにより確認することができる (Figure S1 in 原著論文 6)。興味深いことには、遺伝子

ボディ領域が欠失しているにもかかわらず、翻訳開始上流領域のヌクレオソームの位置のプロファイルは保存されており、プロモータ領域のヌクレオソーム形成が遺伝子ボディ領域とは関連していないことを示唆している。なお、進化的保存度が2番目に高いヒストン脱アセチル化酵素 Rpd3 は先の *A. fumigatus* の RpdA に対応するタンパク質でありその遺伝子欠失株の取得を試みたが、それを得ることができず、さらに実験を継続すべき対象であると考えている。

ヌクレオソーム DNA の長さの分布をコントロールと2つの遺伝子欠失株において比較したところ、*ELP3* 欠失株では短い方へシフトし、*HOS2* 欠失株ではコントロールと大きな違いはなかった。5869のタンパク質コード遺伝子プロモータ領域におけるコントロールと遺伝子欠失株間のヌクレオソームの位置の保存度を比較したところ、*ELP3* 欠失株よりも *HOS2* 欠失株の方がヌクレオソーム位置へ影響が弱いことがわかり (Fig. 7B), *Hos2* の欠失を Rpd3 や *Hos1* が補い (Watson *et al.*, 2000), その影響を抑えた可能性が高い。よって、ゲノム全体に与えた影響が低く、ヌクレオソーム DNA の長さの変化を検出できなかったと考えられる。おそらく、*HOS1* との二重破壊株などを用いることによりゲノムワイドな影響を見ることができると考えている。

また、*ELP3* 欠失株におけるヌクレオソーム DNA の縮小はヒストンアセチル化レベルの低下による影響と考えられ、*A. fumigatus* への TSA 処理による過剰ヒストンアセチル化によるヌクレオソーム DNA の伸長と矛盾しない。これらの結果より、コアヒストンのアセチル化が巻きついている DNA の長さを伸長させ、脱アセチル化が縮小させると考えられる。この傾向がすべての生物種、少なくとも菌類において一般化できることであるか否かについてはさらに研究が必要であると考えている。ヒストンアセチル化によるヌクレオソーム DNA の伸長の原因は二つ考えられ、一つはヒストンアセチル化修飾によるヒストンタンパク質の体積の増加による影響であり、もう一つはアセチル化によるヒストンの電荷の変化による DNA との相互作用の影響である。前者の場合には DNA のヒストンへの巻きつきはきつくなり、後者の場合には緩んでいると考えられる。

S. cerevisiae の24遺伝子のプロモータ領域におけるヌクレオソームの位置は *ELP3* および *HOS2* 欠失株とともに相関係数が0.5未満と低く、その中の19遺伝子については *ELP3* と *HOS2* 欠失株間で高い相関を持っていた (Table 1)。すなわち、これら19遺伝子については *Elp3* によるヒストンアセチル化と *Hos2* によるヒストン脱アセチル化のヌクレオソーム位置に与える影響が似ていたことを意味しており、ヌクレオソームマップの

結果より、ヌクレオソームの位置に同じ影響を与えるヒストンアセチル化と脱アセチル化の酵素ペアを抽出できることを示している。今後のクロマチン構造の制御機構の研究に応用できる解析方法であると考えている。

ヌクレオソームの形成される領域を DNA 塩基配列のパターンから予測する方法が提唱されているが (Segal *et al.*, 2006), そのパターンは *S. cerevisiae* と *Schizosaccharomyces pombe* では異なることが指摘された (Lantermann *et al.*, 2010)。本研究においてヌクレオソームの位置の保存度が領域において異なることを明らかにしたことより、細胞を取り巻く環境によりヌクレオソームの位置が変化していると考えられ、ヌクレオソームマップを分子生物学実験により示すことの重要性はますます高まっている。また、ヌクレオソームの位置をより正確に求める方法の開発のためにもより多くのデータ収集とその解析が重要である。

ヌクレオソームの位置のプロファイルを比較すること (Fig. 5A) により異なる生物種間のヌクレオソームマップを比較することが可能である。しかし、現状では比較できる菌類種が存在しておらず、本研究において *M. osmundae* および *S. complicata* のゲノム塩基配列を決定しつつある。本研究助成によりゲノムのドラフト塩基配列を決定し、*M. osmundae* については2回のゲノムシーケンシングにより283コンティグまでに達している。現在、共同研究によりヌクレオソームマップおよび RNA マップ解析を進行しつつあり、*A. fumigatus* と同様にヌクレオソーム DNA の長さの分布が2つのピークを持っていることを確認している。現在までのところ、担子菌類のヌクレオソームマップのデータは報告されておらず、*M. osmundae* のヌクレオソームマップは担子菌類として世界初のデータである。

ゲノム DNA における遺伝子領域の決定には RNA マップが有効である。しかし、発現レベルが極めて低いあるいは発現していない遺伝子についてはその領域を RNA マップにより明らかにすることはできない。本研究では、遺伝子発現のレベルにかかわらず、遺伝子プロモータ領域では遺伝子ボディ領域よりもヌクレオソーム位置が保存されていることを示し (Fig. 5B), ヌクレオソームの位置のパターンより遺伝子領域を推定できる可能性を示している。このことを *M. osmundae* のゲノム解析を通して実践することを考えており、もしこの方法により遺伝子領域を特定することができるならば、今後のゲノム解析に大きなインパクトを与え、ゲノム塩基配列上の遺伝子領域の決定において有効な解析方法として期待できる。

今後、*M. osmundae* や *S. complicata* のヌクレオソームマップ解析により、菌類におけるヌクレオソーム構

造および位置に関する多様性を明らかにし、また、菌類の生活環における有性時代、無性時代に特徴的なヌクレオソーム構造や位置が存在しているか否かについて明らかにする。本研究で得られたすべてのプロモータ領域におけるヌクレオソームの位置プロファイルデータをデータベース化し、それらを比較できるシステムを構築する。

要 約

クロマチンは真核細胞生物のゲノム DNA の維持のために最も重要な構造である。真核細胞のゲノム DNA はヒストン 8 量体に 2 回弱巻きつきヌクレオソーム構造を形成しており、ヌクレオソームはクロマチン構造の最小単位である。(1) 糸状子嚢菌類 *Aspergillus fumigatus* のヌクレオソームマップをヌクレオソーム DNA 断片の塩基配列決定により作成した。遺伝子発現が活性化している遺伝子プロモータ領域はほかの領域に比べヌクレオソーム DNA の長さの分布が短い方へシフトしていることを明らかにした。このことはヌクレオソーム DNA の長さがヒストン修飾やヒストンバリエーションと関連していることを示唆していた。(2) そこで、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A (TSA) を処理し、ヒストンアセチル化レベルを上げた細胞のヌクレオソームマップを作成し、非処理のものと比較した。その結果、TSA 処理により、ヌクレオソーム DNA の長さの分布が長い方へシフトすることを示した。ヌクレオソーム密度が高い領域において、TSA によるヌクレオソーム DNA の伸長がヌクレオソームの位置に影響を与えた。しかし、ヌクレオソーム密度が一般的に低いプロモータ領域においては、TSA 処理によるヌクレオソーム DNA 伸長の影響をあまり受けず、ヌクレオソームの位置は高く保存されていた。(3) ヒストンアセチル化とヌクレオソーム DNA の長さおよびヌクレオソームの位置の関係を明らかにするため、子嚢菌酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 (コントロール)、ヒストンアセチル化酵素遺伝子 *ELP3* 欠失変異株、およびヒストン脱アセチル化酵素遺伝子 *HOS2* 欠失変異株のヌクレオソームマップを作成し、比較した。その結果、ヌクレオソーム DNA の長さの分布はコントロールと *HOS2* 欠失株ではほぼ同一であったのに対し、*ELP3* 欠失株では短い方へシフトしていることが分かった。このことは *ELP3* によるヒストンアセチル化の阻害がヌクレオソーム DNA の長さの縮小に影響したと考えられる。遺伝子プロモータ領域におけるヌクレオソームの位置プロファイルを比較したところ、24 遺伝子についてコントロールと *ELP3* 欠失株およびコントロールと *HOS2* 欠失株の双方においてヌクレオソームの位置の

保存度が低くなっている (相関係数 $r < 0.5$) ことを明らかにした。興味深いことに、24 遺伝子の中、19 遺伝子については 2 つの遺伝子欠失変異株間においてプロファイルが似ており、これら 2 つのヒストン修飾タンパク質によるアセチル化と脱アセチル化がヌクレオソーム位置に影響していると考えられる。これらの結果より、遺伝子プロモータ領域におけるヌクレオソームの位置は菌類系統学における一つの指標となることを強く示唆した。(4) 広い範囲の菌類におけるヌクレオソームマップの比較を行うため、菌類分類学上重要な菌類のゲノム塩基配列、ヌクレオソームマップ、および転写ユニットを決定することを始めた。担子菌類 *Mixia osmundae* (authentic strain IAM 14324) およびアナモルフ酵母 *Saitoella complicata* (type strain NBRC 10748, = IAM 12963) を研究対象とし、現在までに *M. osmundae* 283 コンティグ DNA 配列 (13,393,708 塩基) および *S. complicata* 7981 コンティグ DNA 配列 (12,981,880 塩基) を決定し、国際的 DNA データベースに登録した。

本研究助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 西田洋巳, 本山高幸, 山本尚吾, 油谷浩幸, 長田裕之 (2009). カビの全ゲノムワイドヌクレオソームマップ解析. 第 3 回日本ゲノム微生物学会, 東京.
- 2) 西田洋巳, 本山高幸, 山本尚吾, 油谷浩幸, 長田裕之 (2009). *Aspergillus fumigatus* のヌクレオソームマップ解析. 第 9 回糸状菌分子生物学コンファレンス シンポジウム「ゲノム情報解析とその利用研究の最前線」, 東京.
- 3) 西田洋巳, 本山高幸, 鈴木稜, 山本尚吾, 油谷浩幸, 長田裕之 (2010). トリコスタチン A 処理の *Aspergillus fumigatus* におけるゲノムワイドヌクレオソームマップ解析. 第 4 回日本ゲノム微生物学会, 福岡.
- 4) Nishida, H. (2010). Genome-wide map of fungal nucleosomes by the massively parallel DNA sequencing. Seminar, Center for Informational Biology, Ochanomizu University, Tokyo.
- 5) Nishida, H., Motoyama, T., Suzuki, Y., Yamamoto, S., Aburatani, H. & Osada, H. (2010). Genome-wide maps of nucleosomes of TSA-treated and untreated cells of *Aspergillus fumigatus*. 9th International Mycological Congress, Symposium "Fungal epigenetics", Edinburgh, UK.
- 6) Nishida, H. (2011). Nucleosomal DNA length and nucleosome positioning. 2nd World DNA and Genome Day, Dalian, China.
- 7) 西田洋巳 (2011). 菌類のヌクレオソームマップ解析の意義. 第 32 回糸状菌遺伝子研究会, 東京.
- 8) Nishida, H. (2011). Comparison of nucleosome positions in promoters of orthologous genes between *Aspergillus fumigatus* and *Saccharomyces cerevisiae*. 4th International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology BioMicroWorld

2011, Málaga, Spain.

- 9) 西田洋巳 (2011). 菌類のヌクレオソームマッピング比較解析. 第5回日本ゲノム微生物学会 若手の会研究会, 静岡.

原著論文

- 1) Nishida, H. (2009). Evolutionary conservation levels of subunits of histone-modifying protein complexes in fungi. *Comp. Funct. Genomics* **2009**: 379317.
- 2) Nishida, H., Motoyama, T., Yamamoto, S., Aburatani, H. & Osada, H. (2009). Genome-wide maps of mono- and di-nucleosomes of *Aspergillus fumigatus*. *Bioinformatics* **25**: 2295-2297.
- 3) Nishida, H. (2009). Calculation of the ratio of the mononucleosome mapping number to the dinucleosome mapping number for each nucleotide position in the *Aspergillus fumigatus* genome. *Open Access Bioinformatics* **1**: 1-6.
- 4) Nishida, H., Motoyama, T., Suzuki, Y., Yamamoto, S., Aburatani, H. & Osada, H. (2010). Genome-wide maps of mononucleosomes and dinucleosomes containing hyperacetylated histones of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE* **5**: e9916.
- 5) Nishida, H., Nagatsuka, Y. & Sugiyama, J. (2011). Draft genome sequencing of the enigmatic basidiomycete *Mixia osmundae*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **57**: 63-67.
- 6) Matsumoto, T., Yun, C. -S., Yoshikawa, H. & Nishida, H. (2011). Comparative studies of genome-wide maps of nucleosomes between deletion mutants of *elp3* and *hos2* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* **6**: e16372.
- 7) Yun, C. -S. & Nishida, H. (2011). Distribution of introns in fungal histone genes. *PLoS ONE* **6**: e16548.
- 8) Nishida, H. & Yun, C. -S. (2011). Extraction of tentative mobile introns in fungal genes. *Mobile Genet. Elements* **1**: 78-79.
- 9) Nishida, H., Hamamoto, M. & Sugiyama, J. (2011). Draft genome sequencing of the enigmatic yeast *Saitoella complicata*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **57**: 243-246.

その他 (総説など)

- 1) 西田洋巳 (2010). ヌクレオソーム DNA の長さと言伝子発現 糸状菌 *Aspergillus fumigatus* のヌクレオソームマップ. *化学と生物* **48**: 379-380.

保存機関に委託した菌株

なし

謝 辞

本研究は公益財団法人発酵研究所研究助成 (平成20年4月より平成23年3月まで) により行われました。ここに深く感謝いたします。共同で研究を行いました東京

大学大学院農学生命科学研究科アグリバイオインフォマティクスのポストドク研究員尹忠録博士に感謝いたします。

文 献

- Bauer, R., Begerow, D., Sampaio, J. P., Weiß, M. & Oberwinkler, F. (2006). The simple-septate basidiomycetes: a synopsis. *Mycol. Progress* **5**: 41-66.
- Bernstein, B. E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D. K., Huebert, D. J., McMahon, S., Karlsson, E. K., Kulbokas 3rd, E. J., Gingeras, T. R., Schreiber, S. L. & Lander, E. S. (2005). Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**: 169-181.
- Dennis, J. H., Fan, H. Y., Reynolds, S. M., Yuan, G., Meldrim, J. C., Richter, D. J., Peterson, D. G., Rando, O. J., Noble, W. S. & Kingston, R. E. (2007). Independent and complementary methods for large-scale structural analysis of mammalian chromatin. *Genome Res.* **17**: 928-939.
- Goto, S., Sugiyama, J., Hamamoto, M. & Komagata, K. (1987). *Saitoella*, a new anamorph genus in the Cryptococcaceae to accommodate two Himalayan yeast isolates formerly identified as *Rhodotorula glutinis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **33**: 75-85.
- Lantermann, A. B., Straub, T., Strålfors, A., Yuan, G. C., Ekwall, K. & Korber, P. (2010). *Schizosaccharomyces pombe* genome-wide nucleosome mapping reveals positioning mechanisms distinct from those of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**: 251-257.
- Lee, C. -K., Shibata, Y., Rao, B., Strahl, B. D. & Lieb, J. D. (2004). Evidence for nucleosome depletion at active regulatory regions genome-wide. *Nat. Genet.* **36**: 900-905.
- Lee, W., Tillo, D., Bray, N., Morse, R. H., Davis, R. W., Hughes, T. R. & Nislow, C. (2007). A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. *Nat. Genet.* **39**: 1235-1244.
- Liu, C. L., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Schreiber, S. L., Friedman, N. & Rando, O. J. (2005). Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol.* **3**: e328.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251-260.
- Mavrich, T. N., Jiang, C., Ioshikhes, I. P., Li, X., Venters, B. J., Zanton, S. J., Tomsho, L. P., Qi, J., Glaser, R. L., Schuster, S. C., Gilmour, D. S., Albert, I. & Pugh, B. F. (2008). Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature* **453**: 358-362.
- Nishida, H., Ando, K., Ando, Y., Hirata, A. & Sugiyama, J. (1995). *Mixia osmundae*: transfer from the Ascomycota to the Basidiomycota based on evidence from

- molecules and morphology. *Can. J. Bot.* **73** (Suppl 1): S660-S666.
- Nishida, H., Kondo, S., Suzuki, T., Tsujimura, Y., Komatsu, S., Wakayama, T. & Hayashizaki, Y. (2008). An epigenetic aberration increased in intergenic regions of cloned mice. *Mamm. Genome* **19**: 667-674.
- Nishida, H., Robert, V. & Sugiyama, J. (2011). *Mixia* C.L. Kramer emend. H. Nishida, K. Ando, Y. Ando, Hirata & Sugiyama. Kurtzman, C. P., Fell, J. W. & Boekhout, T. (eds) *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 5th ed., Elsevier, Amsterdam, pp. 1499-1502.
- Nishida, H. & Sugiyama, J. (1993). Phylogenetic relationships among *Taphrina*, *Saitoella*, and other higher fungi. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 431-436.
- Nishida, H., Suzuki, T., Kondo, S., Miura, H., Fujimura, Y. & Hayashizaki, Y. (2006). Histone H3 acetylated at lysine 9 in promoter is associated with low nucleosome density in the vicinity of transcription start site in human cell. *Chromosome Res.* **14**: 203-211.
- Roh, T. Y., Cuddapah, S. & Zhao, K. (2005). Active chromatin domains are defined by acetylation islands revealed by genome-wide mapping. *Genes Dev.* **19**: 542-552.
- Schones, D. E., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T. Y., Barski, A., Wang, Z., Wei, G. & Zhao, K. (2008). Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell* **132**: 887-898.
- Segal, E., Fondufe-Mittendorf, Y., Chen, L., Thåström, A., Field, Y., Moore, I. K., Wang, J. P. & Widom, J. (2006). A genomic code for nucleosome positioning. *Nature* **442**: 772-778.
- Shivaswamy, S., Bhinge, A., Zhao, Y., Jones, S., Hirst, M. & Iyer, V. R. (2008). Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation. *PLoS Biol.* **6**: e65.
- Suzuki, Y. & Sugano, S. (2003). Construction of a full-length enriched a 5'-end enriched cDNA library using the oligo-capping method. *Methods Mol. Biol.* **221**: 73-91.
- Tribus, M., Bauer, I., Galehr, J., Rieser, G., Trojer, P., Brosch, G., Loidle, P., Haas, H. & Graessle, S. (2010). A novel motif in fungal class 1 histone deacetylases is essential for growth and development of *Aspergillus*. *Mol. Biol. Cell* **21**: 345-353.
- Tsankov, A. M., Thompson, D. A., Socha, A., Regev, A. & Rando, O. J. (2010). The role of nucleosome positioning in the evolution of gene regulation. *PLoS Biol.* **8**: e1000414.
- Valouev, A., Ichikawa, J., Tonthat, T., Stuart, J., Ranade, S., Peckham, H., Zeng, K., Malek, J. A., Costa, G., McKernan, K., Sidow, A., Fire, A. & Johnson, S. M. (2008). A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Genome Res.* **18**: 1051-1063.
- Watson, A. D., Edmondson, D. G., Bone, J. R., Mukai, Y., Yu, Y., Du, W., Stillman, D. J. & Roth, S. Y. (2000). Ssn6-Tup1 interacts with class I histone deacetylases required for repression. *Genes Dev.* **14**: 2737-2744.
- Yuan, G. C., Liu, Y. J., Dion, M. F., Slack, M. D., Wu, L. F., Altschuler, S. J. & Rando, O. J. (2005). Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science* **309**: 626-630.

文化財の生物劣化にかかわる菌類分子群集解析 および DNA バーコードの実用化

安 光 得

株式会社テクノスルガ・ラボ
〒424-0065 静岡県静岡市清水区長崎 330 番地

Fungal community analysis to elucidate the cause of biodeterioration of
cultural properties and evaluate fungal DNA barcoding for species
identification

Kwang-Deuk An

TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd.
330 Nagasaki, Shimizu-ku, Shizuoka, Shizuoka 424-0065, Japan

The Takamatsuzuka Tumulus, located in Asuka-mura, Nara Prefecture, Japan, is known for the 1,300-year-old mural paintings drawn directly onto thin plaster in the small stone chamber interior. Fungal outbreaks caused serious biodeterioration and ultimately led to the relocation of the stone chamber in 2007. An aim of this study was to identify the mycobiota in the samples from the Takamatsuzuka Tumulus using fungal community analysis and the cultivation method, and to determine the invasion pathway of fungi into the stone chamber interior. Fungal community analysis by ribosomal RNA genes and protein-coding genes led to the detection of high ratios of Eurotiales, Hypocreales, Chaetothyriales, Helotiales, and Saccharomycetales in the Ascomycota. These were the same mycobiota revealed by the cultivation method. When a diverse mycobiota was expected, it was effective to use the community analysis method together with the cultivation method. Our fungal community analyses suggested that a variety of ecological groups inhabited the stone chamber interior and its environs. The possible origin and invasion route of fungi into the stone chamber has been thought to be the surrounding soil (mainly by waters), plant substrates, air, and some arthropods (e.g., mites and collembolans). The research into the origin and invasion route of fungi has also focused on the contribution to conservation science for cultural properties and studies of fungal species diversity broadly, including an examination of the usefulness of fungal identification using DNA barcodes. As a result, ITS and LSU were found to be superior in the PCR amplification and species identification in *Acremonium* s. lat., and thus they were applied to the identification of Takamatsuzuka Tumulus isolates. The *rpb1* was superior to other genes in species identification of *Cladosporium*. We conclude that ITS and LSU in *Acremonium* s. lat. are effective as DNA barcode standard genes, whereas *rpb1* is a useful barcode gene in *Cladosporium*.

Key words: mycobiota, Takamatsuzuka Tumulus, biodeterioration, fungal DNA barcodes, fungal community analysis

現所属：独立行政法人理化学研究所 バイオリソースセンター
微生物材料開発室

E-mail: akdlki@jcm.riken.jp

共同研究者：喜友名朝彦（株式会社テクノスルガ・ラボ），
富田順子（株式会社テクノスルガ・ラボ），佐
野千絵（独立行政法人国立文化財機構東京文化
財研究所），木川りか（独立行政法人国立文化
財機構東京文化財研究所），岡田元（独立行政
法人理化学研究所；最終年度から参加）

緒 言

高松塚古墳は、奈良県高市郡明日香村（国営飛鳥歴史公園内）に所在する古墳であり、7世紀末から8世紀初めに築造された終末期古墳である。1972年3月に鮮やかに彩色された壁画が発見されたことで注目された。

石室（石槨）は16枚の凝灰岩製切石で構成され、内部は長さが約 2.7 m、幅が約 1 m、高さが約 1.1 m の狭小な空間で高湿度（約 RH 100%）と温度も年間を通じて 14～20℃ の範囲にあり、暗所の環境に保たれた。壁画は厚さ数ミリの漆喰を塗った上に描かれている。壁画は天井には星宿図（天文図）が、東壁には男子群像・青龍・日像・女子群像、西壁には男子群像・白虎・月像・女子群像、北壁には玄武が描かれている。中でも西壁女子群像は「飛鳥美人」の呼称で親しまれている。南壁には朱雀が描かれていた可能性が高いといわれているが、漆喰の大半が消失しており、その痕跡は認められない（建石ら、2010）。古墳は1973年4月23日づけで特別史跡に、また多彩色壁画は、1974年4月17日づけで国宝に指定されたが、一般公開されていなかった。

文化庁ホームページ

(http://www.bunka.go.jp/takamatsu_kitora/hekiga_hozonkanri.html)

の記録によると、1972年3月に発掘された直後から、石室内からは黒斑点のコロニーを形成するカビ (*Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Nigrospora* sp.) や緑斑点のカビ (*Trichoderma viride*) が同定された。1975年には石室（石槨）内でそれまで認められなかったカビ (*Doratomyces* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Mucor* sp.) が分離・同定された (Arai, 1984; 新井, 1987, 1990)。さらに、1976年から1980年代初期の修復の期間に、*Doratomyces* sp. と *Streptomyces* sp. などの微生物の大発生が石室内の壁面で起きた (Arai, 1984; 新井, 1987, 1990)。1986, 1987両年には放線菌と他の菌類と一緒に *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* が分離され (Arai, 1984; 新井, 1987, 1990), 1994年から2000年には *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* などが検出された (木川ら, 2006)。当時、これらの菌群は石室内において絶えず出現していたが、壁画へ深刻な損傷を引き起こさなかった。石室内部の菌類相 (mycobiota) は比較的安定していた。2001年春に実施された高松塚古墳の取合部と呼ばれる石室内部と保存施設をつなぐ小空間の天井崩落止め工事以降、カビが取合部および石室内部に発生・拡大し、さらには石室壁面上にバイオフィーム (菌類と細菌の混生体) が出現するなど、微生物の種類や特徴、微小動物 (ダニ, トビムシなど) や内部環境との関係も含め、その実体を究明することが必要となった (Kigawa *et al.*, 2009; 木川ら, 2010)。そのため微生物の十分な特徴づけ、系統分類学的な同定や微生物相の解明を目的とし、2004年5月以降、2007年石室解体作業を経て、2008年の墳丘部発掘調査終了まで適時石室内外の微生物調査 (目視レベル) を行ない、その際従来とは異なる試料採取法や微生物

物分離法、遺伝子塩基配列に基づく分子系統解析等も取り入れて、個々の微生物の特徴づけと種レベルの同定を行ってきた (Sugiyama *et al.*, 2008, 2009; Kiyuna *et al.*, 2008, 2011; An *et al.*, 2009; Nagatsuka *et al.*, 2009)。また、2008年5月設置された「高松塚古墳壁画劣化原因調査検討会」(文化庁)により、壁画の劣化原因を多角的な観点から検証することが試みられ、2年後の2010年3月にその科学的・学術的な分析結果の概要が報告書として公表されている (高松塚古墳壁画劣化原因調査検討会, 2010)。なお、取り出された石室石材と壁面は現在、古墳近くの仮修理施設において修理作業が進められている。

一方、上述の報告書 (高松塚古墳壁画劣化原因調査検討会, 2010) の中で指摘されているが、文化財を保存する上で文化財保存環境から劣化原因となる因子のデータ収集が欠かせない。とくに微生物が当該生物劣化に深く関与している場合、個々の微生物の生物学的特徴づけと正確な種レベルの同定に基づく微生物相 (microbiota) の迅速な量的、質的把握が必要不可欠である。菌類でも DNA バーコード化の実用化に向けての動きが活発になりつつある。DNA バーコード化とは、短い汎用性のある遺伝子の塩基配列を調べることで、生物の種類を簡単・迅速に識別するようにしようというものである。DNA バーコードの始まりはカナダのゲルフ大学 (University of Guelph) の Paul Hebert 博士らが2003年に発表した“Biological identifications through DNA barcodes” と言われている (Hebert *et al.*, 2003)。その後、ワークショップでの議論を重ねてミトコンドリアゲノムにコードされる COI 遺伝子の部分塩基配列 (648 bp) が、高等動物における DNA バーコード化の有力なマーカーとして決定された。DNA バーコード化の中心組織は現在、Consortium of the Barcode of Life (CBOL) (<http://www.barcodeoflife.org/>) である。

菌類バーコード化の本格的な動きは2007年春、米国のバージニアで開催された All Fungi Barcode of Life Planning Workshop (13-15 May 2007, Smithsonian Conservation and Research Center, Front Royal, Virginia) からであり、同年9月には台湾で All Fungi Barcoding Second Planning Workshop が開催された (Rossman, 2007)。両国際研究集会の要点としてはまず、菌類をバーコード化するために標準遺伝子領域について議論された。DNA バーコード遺伝子は、「短い塩基配列であること、多コピー間による違いが少ないこと、強力なプライマーサイトを持つこと、種間の違いを表すことなど」が条件である (Rossman, 2007; Kress & Erickson, 2008)。生物劣化から文化財を守るためには、劣化の主原因微生物を迅速・正確に同定し、適切な方法

で対策を取らなければならない。この観点から、菌類 DNA バーコードの実用化は文化財保存科学とも深い関係を持つ。

本研究前半では、まず高松塚古墳の石室内外の菌類群集解析を DGGE 解析およびクローン解析で行い、培養法による分離・同定結果と比較分析することによって、より正確な菌類相の全体像を把握することで、石室内への菌類の進入経路を探ることとした。後半では DNA バーコードによる菌類の迅速同定法について検討し、広く文化財環境の菌類相のモニタリングならびに菌類多様性研究に寄与することを目指した。

実験方法

群集解析

試料採取 分析試料は採取場所別に、高松塚古墳の墳丘部、石室内部からの石室内、石室を囲む部分からの石室外、石室を構成する壁石と壁石の間からの壁石間、石室内部と保存施設の接続部からの取合部の五つのカテゴリーに分けられた (Fig. 1; Table 1 参照)。解析に用いた試料は2006年12月から2009年2月の期間内に採取した試料のうち、土壌、バイオフィルム、漆喰片、植物基質など様々な基質からなる計50点を解析に供した (Table 1)。本研究では、古墳は特別史跡、壁画は国宝という厳しい制約の下に、サンプリングを行ったため、石室内および取合部の試料は少なかった。

分離培養 各試料に対して、平板塗布法と湿室法等を併用して、菌類の分離・培養をおこなった (Sugiyama *et al.*, 2008, 2009; Kiyuna *et al.*, 2008)。

DNA 抽出 各試料からビーズによる菌の物理的破壊と FastDNA® Spin Kit for Soil (Qbiogene) を用いて、添付のマニュアルに従い、DNA を抽出した。

DGGE 解析 DGGE には SSU rRNA 遺伝子 (SSU) とタンパク質コード遺伝子の β -tubulin を用いた。PCR プライマーセットは、SSU には 1427f-GC clamp (5'-CG CCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCC GCCCTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGG-3') / 1616r (5'-GCGGTGTGTACAAAGGGCAGGG-3') (Van Hannen *et al.*, 1998) を、 β -tubulin には Bt2a-GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCCGCCCCGCGTAAACCAATCGGTGCT GCTTTC-3') / Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCT TGGC-3') (Glass & Donaldson, 1995) を用いた。PCR 反応は AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied

Biosystems, CA, USA) を使用し、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) で増幅した。PCR 条件は、最初の熱変性を 94°C 3分、熱変性 94°C 1分、アニーリング 65°C 1分後 2 サイクルごと 1°C ずつ下げながら伸長反応 72°C 2分の 3 段階を 20 サイクル行った後、熱変性 94°C で 1分、プライマー熱変性 55°C 1分、72°C で 2分の 3 段階を 15 サイクル、最後の伸長反応を 72°C で行った。DGGE 解析は、変性剤 (40% ホルムアミドと 7M 尿素の混合液) を 25-65% の濃度勾配として含む 8% ポリアクリルアミドゲルを用いた。泳動には Bio-Rad DCode System (Bio-Rad, CA, USA) を使用し、60°C、50 V で 20 時間 (SSU) / 12 時間 (β -tubulin) 行った。電気泳動後、SYBR Green I (Invitrogen - Molecular Probes, SP, Brazil) で染色し、各 DNA 断片をゲルから切り出し精製した。この DNA 断片を用いて、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems) を使用し、ABI3130xl DNA sequencer (Applied Biosystems) を用いて塩基配列を決定した。

クローン解析 SSU とタンパク質コード遺伝子のうち、 β -tubulin、リジン生合成遺伝子 *lys2*、ミニ染色体維持タンパク質遺伝子 *mcm* を用いた。プライマーセットは、SSU では 351f と 1427r (Mitchell & Zuccaro, 2006; van Hannen *et al.*, 1998)、 β -tubulin では Bt2a と Bt2b (Glass & Donaldson, 1995)、*lys2* では *lys2F* と *lys2R* (An *et al.*, 2002)、*mcm* では *mcm7-709for* と *mcm7-1348rev* (Schmitt *et al.*, 2009) を使用した。クローニングには TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen-Molecular Probes, SP, Brazil) を用いて行い、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems) を使用し、ABI3130xl DNA sequencer (Applied Biosystems) で解析して塩基配列を決定した。

分子系統解析 各解析から得られた塩基配列および国際塩基配列データベースから入手した塩基配列をデータセットとして作成した。分子系統解析には MEGA

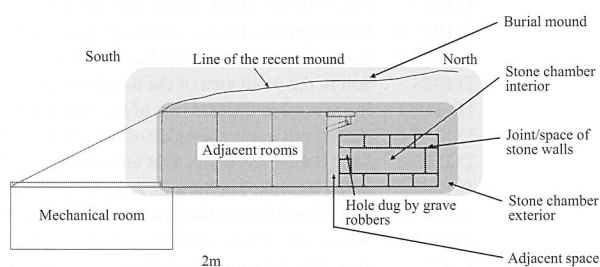


Fig. 1 Schematic diagram of a side view of the conservation facilities and stone chamber of the Takamatsuzuka Tumulus.

Table 1 Samples used in this study

Sample category	Sample No.	Sources	SSU		β-tubulin		<i>mcm</i>	<i>lys2</i>
			DGGE Lane No.	Clone library sample No.	DGGE Lane	Clone library sample	Clone library sample	Clone library sample
Stone chamber interior	T61213-2	Blackish viscous gels on the paintings of the group of women on west	1	C1				
	T61213-8	Viscous gels below the paintings of the group of women on east wall	2					
	T61213-12	Viscous gels upper area on north wall	3	C2				
	T61213-17	Soil on the floor below the east wall 2	4	C3				
Adjacent space	T7521-8b	Plastic cover over the thieving hole (adjacent space side)	5	C4	○	○	○	○
	T7214-14k	Black spots on the exposed ceiling stone wall in the adjacent space	6					
	T7302-8	Green-yellowish mat on the soil layer under the crater in the adjacent space	7	C5	○	○	○	○
Stone chamber exterior	T7409-1	Blackish materials behind the north wall	8	C6	○	○	○	○
	T7302-11	Black spots on the surface soil in the northwest area	9	C7				
	T7601-3	Soil in the levee behind the east wall 2	10					
	T7302-10	Blackish soils on the surface of the ceiling stone wall 2	11	C8				
	T7302-12	Soil in the ditch in the northwest area	12					
	T7821-16	Soil undersurface of the floor stone 2	13					
	T7829-1	Soil under the floor stone 4	14					
	T7829-2	Soil under the floor stone 3	15					
	T7829-3	Soil under the floor stone 2	16					
	T7426-17	Soil in the levee behind the west wall 3	17					
	T7601-4	Soil in the levee behind the west wall 2	18					
	T7604-8	Soil in the levee behind the west wall 1	19	C9				
	T7426-18	Blackish soil back side of the east wall 3	20					
	T7604-5	Soil in the levee behind the east wall 1	21	C10		○	○	○
Joint/space of stone walls	T7615-9	Brownish soil on the floor 1 (under the south stone wall)	22	C11				
	T7607-1	Joint plaster between the east wall 1 and 2	23					
	T7510-7	Blackish viscous gels on the north-lateral side of the west stone wall 2	24	C12	○	○	○	○
	T7521-8a	Plastic cover over the thieving hole (stone chamber side)	25	C13				
	T7413-6	Blackish particle plasters between north and east stone wall 3	26					
	T7517-4	Blackish materials on the north-lateral side of the east stone wall 2	27	C14				
	T7413-2	Blackish materials between north and west stone wall 3	28					
	T7614-2	Soil and plasters on the bonded surface of the west stone wall 1 and 2	29	C15				
	T7615-5	Black-brwnish viscous gels on the south-lateral side of the east stone wall 1	30	C16				
	T7530-16	Blackish viscous gels on the south-lateral side of the west stone wall	31					
	T7615-10	Blackish viscous gels on the south-lateral side of the west stone wall	32					
	T7417-21	Plant roots and plasters between the north stone wall and floor 4	33	C17				
	T7607-4	Plaster and soil undersurface of the east wall 2	34					
	T7626-14	Soil undersurface of the west wall 1	35					
Burial mound	T8804-4	Clay-rich soil upper area in the east side of the restration facility	40					
	T81027-1	Soil (Hanchiku) in the southeast area of the burial mound	41					
	T81027-2	Soil in the east area of the burial mound	42					
	T81028	Soil in the north area of the burial mound	43					
	T81119-1	Buried soil in the east side of the restration facility	44					
	T81119-2	Buried soil in the west side of the restration facility	45	C18				
	T81203-2	Soil (Hanchiku) in the west area of the burial mound	46					
	T81203-3	Soil (Hanchiku) in the east area of the burial mound	47	C19				
	T81203-5	Soil (Hanchiku) in the east area of the burial mound	48	C20				
	T81203-9	Soil on the surface of the west tuff 8 in the adjacent space	49	C21	○	○	○	○
T9217	Soil (Hanchiku) in the southwest area of the burial mound	50	C22					

ver4.0 (Tamura *et al.*, 2007) を用いてアライメントおよび系統樹を作成した。

DNA バーコード

供試菌株 高松塚古墳壁画の“黒シミ”の正体であった暗色系 *Acremonium* (Kiyuna *et al.*, 2011) 5 株を含む広義の *Acremonium* 属のうち JCM に保存されている 43 株の計 48 株と幅広い文化財の生物劣化に関わるとされる *Cladosporium* 属のうち JCM に保存されている 65 株を用いた。

DNA 抽出および PCR DNA 抽出には DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いた。PCR は puReTaq Ready-To-Go PCR beads (Amersham Biosciences, NJ, USA) とプライマーセットとして ITS では ITS5 と ITS4 (White *et al.*, 1990), LSU では NL1 と NL4 (O'Donnell, 1993), *rpb1* では RPB1-Af (Stiller & Hall, 1997) と RPB1-Cr (Matheny *et al.*, 2002), β -tubulin では Bt2a と Bt2b (Glass & Donaldson, 1995), *mcm* では *mcm7*-709for と *mcm7*-1348rev (Schmitt *et al.*, 2009) を使用した。GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems) 上で行った。シーケンシング反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems) を使用し、ABI3130xl DNA sequencer (Applied Biosystems) で解析し塩基配列を決定した。

分子系統解析 各解析から得られた塩基配列をデータセットとして作成した。分子系統解析には MEGA ver4.0 (Tamura *et al.*, 2007) を用いてアライメントおよび系統樹を作成した。系統樹の推定には近隣結合法を用い、各系統枝の信頼度はブーツストラップ法により評価した。

結果と考察

菌類群集解析 試料 50 点から SSU による DGGE 解析を行った泳動写真 (Fig. 2) では、すべての試料からバンドが得られた。採取箇所別では取合部の試料から多数のバンドが確認できた。129 本のバンド解析の結果から、多く検出された菌類群は子囊菌門が 75%、担子菌門 6%、接合菌門 4%、その他 (菌類以外含む) 14% であった (Table 2)。子囊菌門を目レベルで見ると、Eurotiales, Helotiales, Hypocreales, Chaetothyriales, Saccharomycetales が多く検出された。属レベルで割合が高いものは順に *Exophiala* 11%, *Verticillium* 9%, *Aspergillus* 5%, *Mortierella* 4%, *Penicillium* 3%, *Phialocephala* 3%, *Candida* 3%, *Thermomyces* 3%, *Fusarium* 2% であった (Table 2)。石室内からは Orbiliales が多く検出された。Helotiales は墳丘部と取合部から検出された。Hypocreales は墳丘部、石室外、取合部、壁石間など広い範囲で検出された。特に、壁石間では様々な菌類群が検出された。壁石間と石室外からの試料からは節足動物のトビムシが多く検出されたため、石室内での菌類の発生と何らかの関係があると考えられた。

一方、タンパク質コード遺伝子 β -tubulin を用いて試料 5 点について DGGE 解析を行った。タンパク質コード遺伝子は核リボソーム遺伝子よりコピー数が少なく、中には *mcm* 遺伝子のような単一コピーを持つものもあり (Schmitt *et al.*, 2009), より正確な菌類相が把握できると考えられた。しかし DGGE 泳動写真ではバンドパターンの多様性は少なく、バンドから得られた塩基配列の相同性検索結果からも子囊菌門の Hypocreales と Chaetothyriales に帰属する菌類群しか検出されなかった。

試料 50 点のうち、SSU によるクローン解析では 22 点

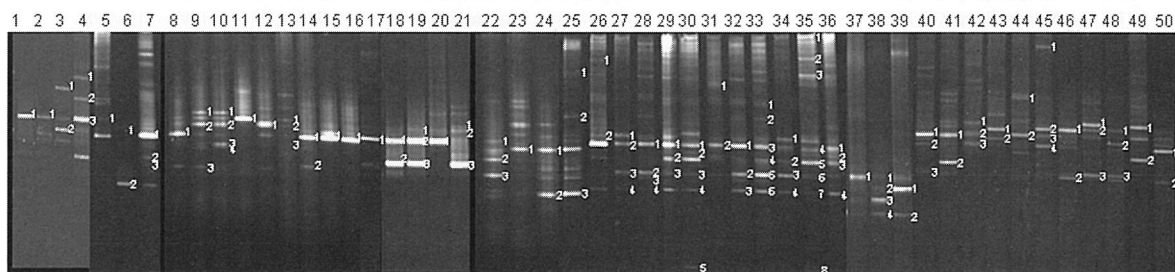


Fig. 2 DGGE profiles of fungal partial SSU fragments amplified from samples of the Takamatsuzuka Tumulus. Lanes 1-4, stone chamber interior samples; Lanes 5-7, adjacent space samples; Lanes 8-21, stone chamber exterior samples; Lanes 22-39, joint stone walls samples; Lanes 40-50, burial mound samples. The sequenced bands were indicated by number (An *et al.*, unpublished).

Table 2 Closest relatives of the bands in the DGGE analysis

DGGE band	Closest relative	Taxonomic assignment	Accession number	Similarity (%)	Alignment
1-2	Uncultured eukaryote isolate TGGE band 11	Ascomycota; Saccharomycetales	AY736096	100	211/211
2-1	Candida parapsilosis strain NRRL Y-12969	Ascomycota; Saccharomycetales	FJ153126	98	207/211
3-1	Orbilia fimicola	Ascomycota; Orbiliales	AF006307	100	211/211
3-2	Candida boidinii strain NRRL Y-2332	Ascomycota; Saccharomycetales	EU011678	99	210/211
4-1	Uncultured eukaryote isolate TGGE band 11	Ascomycota; Saccharomycetales	AY736096	98	185/187
4-2	Uncultured eukaryote isolate TGGE band 11	Ascomycota; Saccharomycetales	AY736096	99	209/211
4-7	Aspergillus terreus isolate Li-20	Ascomycota; Eurotiales	GU573850	100	210/210
5-1	Chaetomium elatum strain T53	Ascomycota; Sordariales	FN666095	98	203/206
6-1	Aspergillus terreus isolate Li-20	Ascomycota; Eurotiales	GU573850	100	210/210
6-2	Phialocephala fortinii strain UAMH 9525	Ascomycota; Helotiales	AY524846	100	205/205
7-1	Phialocephala fortinii strain UAMH 9525	Ascomycota; Helotiales	AY524846	100	205/205
7-2	Sphaeronaemella fragariae	Ascomycota; Microascales	AY271802	99	207/208
7-3	Uncultured ascomycete clone IMRP106	Ascomycota; Incertae sedis	AY343925	97	195/200
8-1	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	99	210/211
9-1	Mortierella sp. CO-21	Zygomycota; Mortierellales	AB521052	99	212/213
9-2	Exophiala salmonis isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	99	212/213
9-3	Tullbergia yosii voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	99	209/210
10-1	Candida parapsilosis strain NRRL Y-12969	Ascomycota; Saccharomycetales	FJ153126	97	207/212
10-2	Exophiala salmonis isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	99	212/213
10-3	Verticillium dahliae	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	99	210/211
10-4	Penicillium allii	Ascomycota; Eurotiales	AF218787	99	213/214
11-1	Phialocephala fortinii strain UAMH 9525	Ascomycota; Helotiales	AY524846	99	211/212
12-1	Exophiala salmonis isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	99	212/213
13-1	Tullbergia yosii voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	209/209
13-2	Mortierellaceae sp. LN07-7-4	Zygomycota; Mortierellales	EU688964	99	213/214
13-3	Phialocephala fortinii strain UAMH 9525	Ascomycota; Helotiales	AY524846	99	211/212
14-1	Calcarisporium arbuscula	Ascomycota; Hypocreales	AY271796	99	209/211
14-2	Aspergillus terreus isolate Li-20	Ascomycota; Eurotiales	GU573850	100	212/212
15-1	Calcarisporium arbuscula	Ascomycota; Hypocreales	AY271796	99	209/211
16-1	Uncultured Neonectria clone LTSP_EUKA_P4J14	Ascomycota; Hypocreales	FJ553819	100	178/178
17-1	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	100	206/206
18-1	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	100	207/207
18-2	Aspergillus terreus isolate Li-20	Ascomycota; Eurotiales	GU573850	100	210/210
19-1	Uncultured fungus clone f	Ascomycota; Incertae sedis	DQ027902	100	210/210
19-2	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	100	207/207
19-3	Aspergillus terreus isolate Li-20	Ascomycota; Eurotiales	GU573850	100	209/209
20-1	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	100	209/209
21-1	Chalara aurea	Ascomycota; Incertae sedis	AF222503	100	210/210
21-2	Uncultured fungus clone f	Ascomycota; Incertae sedis	DQ027902	100	212/212
21-3	Aspergillus terreus isolate Li-20	Ascomycota; Eurotiales	GU573850	100	196/196
22-1	Claviceps purpurea strain: MAFF 240419	Ascomycota; Hypocreales	AB490177	97	206/211
22-2	Auricularia auricula-judae AFTOL-ID 1681	Basidiomycota; Auriculariales	DQ520099	98	210/214
22-3	Tullbergia yosii voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	99	209/210
23-1	Chaetomium elatum strain T53	Ascomycota; Sordariales	FN666095	99	208/209
24-1	Chaetomium elatum strain T53	Ascomycota; Sordariales	FN666095	99	208/209
24-2	Trichocoma paradoxa isolate CBS 788.83	Ascomycota; Eurotiales	FJ358354	99	212/213
25-1	Ostropa barbara isolate AFTOL-ID 77	Ascomycota; Ostropales	AY584666	98	194/197
25-2	Uncultured eukaryote isolate TGGE band 11	Ascomycota; Saccharomycetales	AY736096	100	210/210
25-3	Trichocoma paradoxa isolate CBS 788.83	Ascomycota; Eurotiales	FJ358354	100	206/206
26-1	Aphelenchoides sp. US01	Eukaryote; Nematoda	GU337998	99	207/208
26-2	Mortierella sp. CO-21	Zygomycota; Mortierellales	AB521052	100	210/210
27-1	Mortierella sp. CO-21	Zygomycota; Mortierellales	AB521052	100	198/198
27-2	Exophiala salmonis isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	198/198
27-3	Verticillium dahliae	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	207/207
27-4	Tullbergia yosii voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	207/207
28-1	Exophiala salmonis isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	212/212
28-2	Verticillium dahliae	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	209/209
28-3	Verticillium dahliae	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	99	207/208
28-4	Tullbergia yosii voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	206/206
29-1	Exophiala salmonis isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	210/210
29-2	Fusarium sp. MBS1	Ascomycota; Hypocreales	FJ613599	100	207/207
29-3	Verticillium dahliae	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	208/208
30-1	Exophiala salmonis isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	210/210
30-2	Hohenbuehelia tristis strain RV95/214	Basidiomycota; Agaricales	DQ851573	100	205/205
30-3	Verticillium dahliae	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	206/206
30-4	Tullbergia yosii voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	204/204
30-5	Uncultured organism clone Cluster1069	Ascomycota; Incertae sedis	GU178359	98	197/200
31-1	Rhizoplaea chrysoleuca strain 111	Ascomycota; Lecanorales	AY530883	91	246/270

Table 2 continued

31-2	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	210/210
32-1	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	211/211
32-2	<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	209/209
32-3	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	206/206
33-1	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	209/209
33-2	<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	209/209
33-3	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	210/210
33-4	Fungal sp. FCAS133	Ascomycota; Hypocreales	GQ120161	100	207/207
33-5	<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	209/209
33-6	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	207/207
34-1	<i>Mortierella</i> sp. CO-21	Zygomycota; Mortierellales	AB521052	100	210/210
34-2	<i>Fusarium</i> sp. MBS1	Ascomycota; Hypocreales	FJ613599	100	208/208
34-3	<i>Auricularia auricula-judae</i> AFTOL-ID 1681	Basidiomycota; Auriculariales	DQ520099	99	207/209
34-4	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	207/207
35-1	<i>Septofusidium herbarum</i> strain CBS 265.58	Ascomycota; Hypocreales	AY526480	99	99/100
35-2	<i>Desmodesmus communis</i>	Eukaryote; Chlorophyta	X73994	88	189/214
35-3	<i>Aplanochytrium</i> sp. S1a	Stramenopiles; Labyrinthulida	FJ810216	99	210/211
35-4	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	209/209
35-5	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	100	208/208
35-6	<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	206/206
35-7	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	99	164/165
35-8	Uncultured organism clone Cluster1069	Ascomycota; Incertae sedis	GU178359	98	197/200
36-1	<i>Fusarium</i> sp. 94a	Ascomycota; Hypocreales	AJ557797	99	205/207
36-2	<i>Hohenbuehelia tristis</i> strain RV95/214	Basidiomycota; Agaricales	DQ851573	100	206/206
36-3	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	100	206/206
36-4	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	207/207
37-1	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	161/161
38-1	<i>Verticillium dahliae</i>	Ascomycota; Hypocreomycetidae	AF104926	100	209/209
38-2	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	205/205
38-3	<i>Exophiala salmonis</i> isolate AFTOL-ID 671	Ascomycota; Chaetothyriales	EF413608	100	209/209
38-4	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	207/207
39-1	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	100	207/207
39-2	<i>Tullbergia yosii</i> voucher SIE C040004	Eukaryote; Collembola	DQ016556	100	205/205
40-1	<i>Thermomyces lanuginosus</i> strain ATCC 200065	Ascomycota; Eurotiales	EF468714	97	202/208
40-2	<i>Pestalotiopsis guepinii</i> strain WR-1	Ascomycota; Xylariales	EU375526	94	199/210
40-3	<i>Pestalotiopsis guepinii</i> strain WR-1	Ascomycota; Xylariales	EU375526	98	207/210
41-1	<i>Thermomyces lanuginosus</i> strain ATCC 200065	Ascomycota; Eurotiales	EF468714	97	207/213
41-2	<i>Kavinia himantia</i>	Basidiomycota; Gomphales	AY293138	99	212/213
42-1	<i>Arachnula impatiens</i> strain BaikalA155	Eukaryote; Cercozoa	EU567294	92	196/211
42-2	<i>Thermomyces lanuginosus</i> strain ATCC 200065	Ascomycota; Eurotiales	EF468714	97	206/212
42-3	<i>Hypocrea koningii</i> strain JH	Ascomycota; Hypocreales	EU722404	96	200/208
43-1	<i>Craterellus tubaeformis</i> isolate OSC 49915	Basidiomycota; Cantharellales	DQ898683	98	207/211
43-2	<i>Trichaptum abietinum</i>	Basidiomycota; Polyporales	AF026585	97	171/175
44-1	Uncultured Soil Clone Group I clone N18	Ascomycota; Incertae sedis	EU179935	97	183/188
44-2	Uncultured soil fungus clone CK173	Ascomycota; Incertae sedis	GU568140	87	147/168
45-1	Uncultured cercozoan isolate HetAus17	Eukaryote; Cercozoa	EU709266	97	172/176
45-2	<i>Herpotrichia juniperi</i> isolate AFTOL-ID 1608	Ascomycota; Pleosporales	DQ678029	99	174/175
45-3	<i>Thermomyces lanuginosus</i> strain ATCC 200065	Ascomycota; Eurotiales	EF468714	99	175/176
45-4	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	98	172/174
46-1	Uncultured fungus isolate DGGE band M1-23-5-89	Ascomycota; Incertae sedis	DQ520023	99	175/176
46-2	<i>Phialosimplex caninus</i> strain UAMH 10335	Ascomycota; Eurotiales	GQ169312	98	209/212
47-1	<i>Phiala strobilina</i> strain CBS 643.85	Ascomycota; Incertae sedis	EF596821	97	206/212
47-2	<i>Loramyces macrosporus</i> isolate AFTOL-ID 913	Ascomycota; Helotiales	DQ471005	98	208/211
47-3	<i>Penicillium decumbens</i> isolate K1	Ascomycota; Eurotiales	GU573852	100	212/212
48-1	<i>Candida lactis-condensii</i>	Ascomycota; Saccharomycetales	AB018144	94	199/211
48-2	<i>Malassezia obtusa</i>	Basidiomycota; Malasseziales	EU192365	89	155/173
48-4	<i>Penicillium decumbens</i> isolate K1	Ascomycota; Eurotiales	GU573852	100	212/212
49-1	<i>Scytalidium lignicola</i> strain UAMH 1502	Ascomycota; Helotiales	AY762623	100	212/212
49-2	<i>Penicillium</i> sp. LAC1	Ascomycota; Eurotiales	FN666097	98	204/207
50-1	Uncultured fungus clone T3_IV_1a_11	Ascomycota; Hypocreales	EF628547	100	210/210
50-2	<i>Aspergillus alliaceus</i> strain SIIA 1572	Ascomycota; Eurotiales	EU278606	97	207/213

を用いて行った (Table 1). 得られた1201クローンのバンド解析の結果から, 子囊菌門が83%, 担子菌門5%, 接合菌門0.1%, その他 (菌類以外含む) 12% の割合で菌類群が検出された. 属レベルでは *Exophiala* 19%, *Pichia* 11%, *Phialocephala* 11%, *Penicillium* 8%, *Candida* 6% の順であった. 分子系統解析の結果から, Eurotiales, Helotiales がすべての採取箇所から検出された (Fig. 3). Chaetothyriales は墳丘部と石室内では検出されなかった. 石室内からは子囊菌系酵母の Saccharomycetales が多く検出された (Fig. 3). 一方で, DGGE 解析で多く検出された Hypocreales はクローン解析では検出されなかった. 壁石間と石室外の試料からは, DGGE の結果と同様に節足動物のトビムシが多く検出された.

一方, タンパク質コード遺伝子 β -tubulin, リジン合成遺伝子 *lys2*, ミニ染色体維持タンパク遺伝子 *mcm* を用いて試料6点について約50クローンずつ解析を行った. クローンから決定した塩基配列による相同性検索の結果, DGGE 解析の結果と同様に, ほとんど子囊菌門であり, 菌類の多様性は低かった. β -tubulin を用いた解析の結果, Eurotiales, Chaetothyriales, Hypocreales が多く検出された. しかし, 担子菌門はすべての試料から検出されなかった. 菌類特異的な遺伝子 *lys2* (An *et al.*, 2002) を用いた解析の結果, Eurotiales, Helotiales, Hypocreales が多く検出された. さらに, *lys2* からだけ担子菌門の *Bullera* が検出されたが, SSU, β -tubulin よりは菌類の多様性が少ない結果となった. 単一コピーを持っていると言われている *mcm* を用いた解析では, Eurotiales, Helotiales, Hypocreales が多く検出された. しかし, 担子菌門と子囊菌門の Saccharomycetales はすべての試料から検出されなかった.

高松塚古墳の石室内外の試料を用いた菌類群集解析では, 多様な菌類群が検出され, 大部分が子囊菌門の菌類群であった (Table 2, Fig. 3). これは培養法による分離結果とも一致する. また, 節足動物であるトビムシも石室外, 壁石間で検出された. Dromph (2003) はトビムシが昆虫病原菌類のベクターであることを報告している. Greif & Currah (2007) はトビムシから *Acremonium*, *Beauveria*, *Cladosporium*, *Cryptodoxyla*, *Geomyces*, *Gliocladium*, *Hormiactis*, *Leptographium*, *Oidiodendron*, *Penicillium*, *Verticillium* を分離した. これらの菌類群は高松塚古墳の内外と周辺環境から検出された菌類群と一致するものが多いことから, トビムシが石室内部の生物劣化を引き起こしたと思われる菌類繁殖体の運び屋として重要な役割を果たしたと考えられる. SSU の群集解析と培養法の結果を採取場所ごとに比較してみると (Fig. 4), *Penicillium* などが含まれる Eurotiales は

墳丘部から石室内まですべての場所で幅広く検出された. 壁石間は石室内と石室外・墳丘部などの外部環境との境目であり, 石室内と外部の両方の影響を受ける生息環境であり, 長年にわたる両環境からの微生物の“蓄積場所”であったと考えられる. 各手法で壁石間から多様な菌類群が検出されたことは, そのことを裏付ける結果となった.

また, ある手法だけに検出される菌類群もあった. たとえば, 培養法と DGGE で検出されている Hypocreales はクローン解析では検出されず, また墳丘部のクローン解析では Pleosporales が, DGGE では Xylariales が検出されることから, より正確な菌類相を調べるためには複数の手法を用いる必要があると考えられた. 今回の結果からは, 培養法と DGGE 法を併用することで幅広い菌類相を調べることができた. したがって, 少なくともこの二つの組み合わせが最も菌類相を把握するのに適していると考えられた. タンパク質コード遺伝子による群集解析から菌類の多様性が得られなかったことは, プライマーの改善とデータベースの構築などが必要であることを意味する.

石室内およびその周辺環境から分類学的にも生態的

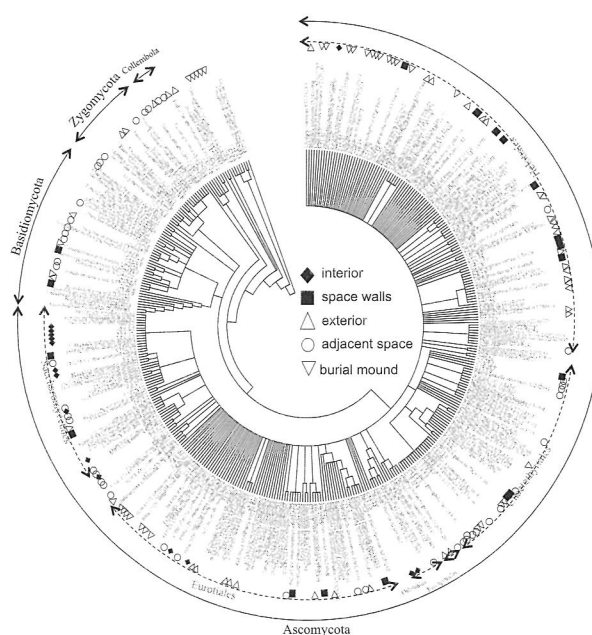


Fig. 3 Phylogenetic relationships among sequences of clones and those of the accession numbers downloaded from GenBank based on NJ analysis of SSU sequence data using MEGA ver4. ◆, clones from the stone chamber interior; ○, clones from the adjacent space; △, clones from the stone chamber exterior; ■, clones from the joint stone walls; ▽, clones from the burial mound (An *et al.*, unpublished).

にも多種多様な菌類が培養法により分離された。それらの由来は、主に土壌、植物基質、空気、節足動物（ダニやトビムシなど）によると推定される (kiyuna *et al.*, 2008; 木川, 2009; 杉山ら, 2009)。侵入経路は、取合部、壁石の隙間や亀裂などが考えられる。

菌類 DNA バーコード 菌類バーコード化の中心的な役割を果たしている International Fungal Working Group (<http://www.fungalbarcoding.org/>) でも検討を行っている遺伝子のうち、ITS, LSU, *rpb1*, β -tubulin, *mcm* の5つの遺伝子で解析を行った。*Acremonium* 属の解析で、PCR から塩基配列の取得までの成功率をみると ITS, LSU で100%, *rpb1* で94%, *mcm* で81%, β -tubulin で40%であった。成功率からは、ITS と LSU が優れていた。どのくらい種の識別に有効なのかを系統解析によって調べた。*Acremonium* 属 (広義の) の分類体系は Gams (1971) によると *Gliomastix* 節 (暗色系), *Acremonium* 節 (明色系), *Nectrioidea* 節 (明色系) に分けられる。ITS と LSU ではほとんど3つの節に分けられた。系統樹 (Fig. 5) から、高松塚古墳壁画の“黒シミ”の正体であった暗色系の *Gliomastix* 節に含まれる種として *A. masseei*, *A. murorum* および石室外環境から分離された *A. polychromum* (Kiyuna *et al.*, 2011) において、両遺伝子ともに種の識別には優れていた。また、キトラ古墳から分離された明色系の *Acremonium* 属分離株 *Acremonium* sp. 15326-15333 (e.g., Kiyuna

et al., 2008) は、今回の結果から、明色系の *Acremonium* 節の *A. kiliense* に帰属すると考えられた。一方、タンパク質コード遺伝子の結果は、*rpb1* 遺伝子以外は PCR から塩基配列の取得までの成功率が低く現時点では有効性は低い。また、*rpb1* 遺伝子も成功率は94%だが、ITS と LSU に比べれば成功率が低い (Fig. 5)。一方、*Cladosporium* 属の解析で、PCR から塩基配列の取得までの成功率をみると ITS, LSU で100%, *rpb1* で92%, *mcm* で49%, β -tubulin で60%であった。成功率では ITS と LSU が100%と最もよかった。しかし、種の識別の結果をみると、たとえば *C. colocasiae*, *C. oxysporum* は ITS では同じグループに含まれて識別困難であった (Fig. 6 の A)。タンパク質コード遺伝子の中では *rpb1* が成功率92%と最も高い結果となった。系統樹による種の識別では ITS で識別困難であった *C. colocasiae*, *C. oxysporum* が *rpb1* では識別可能だった (Fig. 6 の B)。

高等生物につづき菌類研究者からも菌類 DNA バーコード化に関心が高まっている。菌類バーコード化による効果は様々な方面から考えられる。例えば、有害菌類であるか否かを簡単・迅速に識別することで有害菌類の侵入および拡散を防げること、種内の多様性研究および未知の種の検出などが挙げられる。文化財保存にも多く寄与することが期待される。現在、菌類 DNA バーコード化のための標準遺伝子として ITS が有力である。今回の解析結果において、*Acremonium* 属 (広義) は

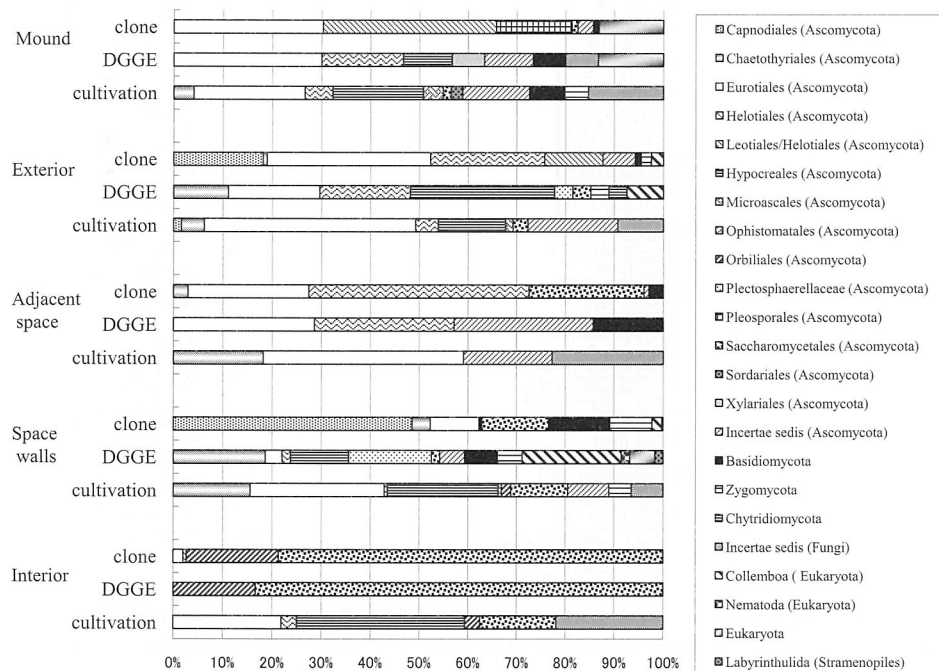


Fig. 4 Comparison of DGGE, clone and the cultivation method (An *et al.*, unpublished).

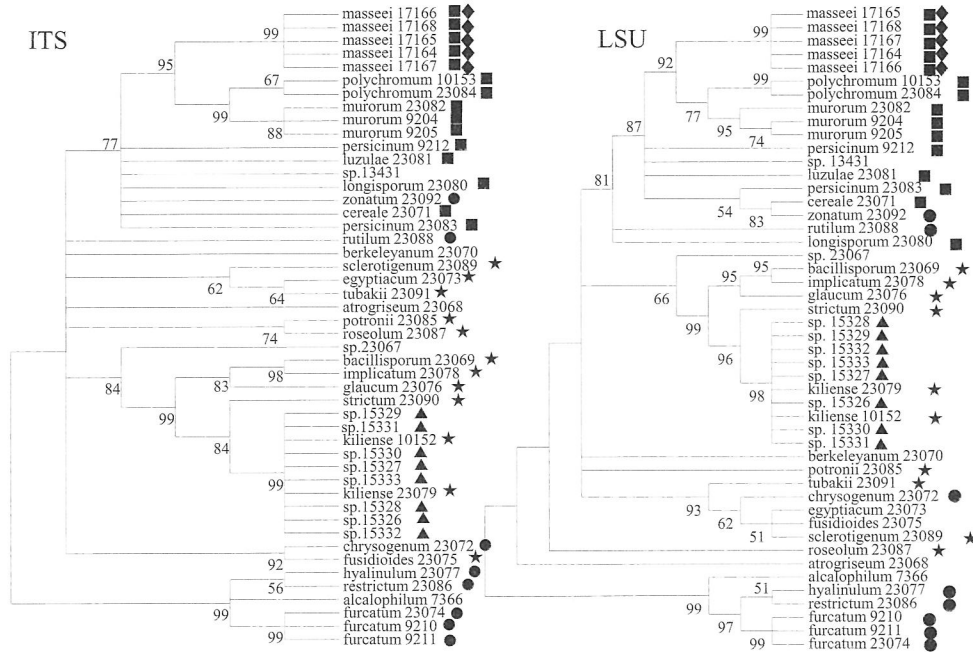


Fig. 5 Phylogenetic relationships of the *Acromonium* sect. *Gliomastix* isolates from Takamatsuzuka and Kitora Tumuli with the JCM reference strains, based on NJ analyses of ITS and LSU sequence data using MEGA ver4.0. Numbers on the branch nodes represent bootstrap support values (%) based on 1000 replications; >50% bootstrap values reindicated. ■, section *Gliomastix*; ★, section *Acromonium*; ●, section *Nectrioidea*; ◆, Takamatsuzuka Tumulus isolates; ▲, Kitora Tumulus isolates (An *et al.*, unpublished).

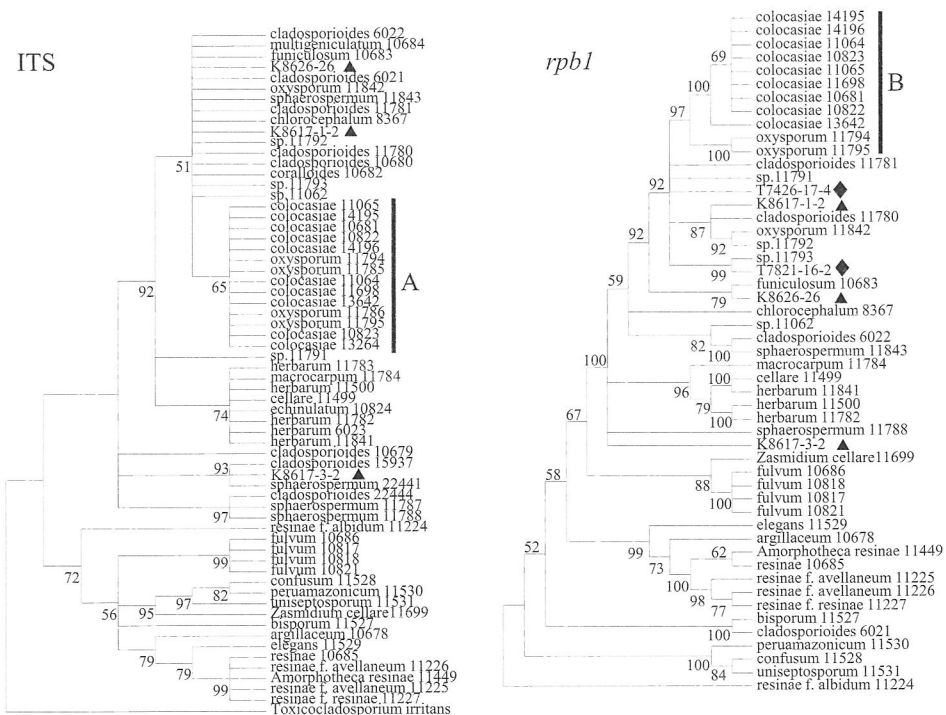


Fig. 6 Phylogenetic relationships of the *Cladosporium* isolates from Takamatsuzuka and Kitora Tumuli with the JCM reference strains, based on NJ analyses of ITS and *rpb1* sequence data using MEGA ver4.0. Numbers on the branch nodes represent bootstrap support values (%) based on 1000 replications; >50% bootstrap values reindicated. ◆, Takamatsuzuka Tumulus isolates; ▲, Kitora Tumulus isolates (An *et al.*, unpublished).

ITS, LSU, *Cladosporium* 属は, *rpb1* が DNA バーコード化のための標準遺伝子として有効であることが示された。菌類全般では ITS の情報および種識別能力は現時点で一番優れていると考えられるが, 分類群によっては ITS で適用できない分類群もあることを常に念頭にしながら, 議論していかなければならないと考えられる。少なくとも, 菌類においては, 形態観察等で属あるいは種まで識別できるのであれば属ごとに形態情報などの表現形質を集約した種の識別データベースも必要と思われる。今後さらに文化財環境のモニタリング確立に向けて菌類バーコードの実用化について研究を深めることが必要である。

要 約

分子群集解析と分離・湿室培養法により高松塚古墳の採取試料における菌類相を正確に把握し, 主に石室内への菌類の侵入経路を探る目的で行った本研究では, 核リボソーム遺伝子およびタンパク質コード遺伝子による群集解析の結果, 子囊菌門の Eurotiales, Hypocreales, Chaetothyriales, Helotiales, Saccharomycetales が培養法と同様に高い割合で検出された。単一コピーと言われる *mcm* では子囊菌門の Eurotiales, Hypocreales, Helotiales が多く検出された。これらの結果は試料本来の菌類相を反映していると考えられ, 多様な菌類相を把握する上で, 培養法と併用することは有効であると考えられた。各試料から得られた菌類相の比較分析から, 石室内への菌類の侵入経路として壁石の隙間, 亀裂, 盗掘口などが, また, それら菌類の由来または侵入媒介手段として土壌, 植物基質, 空気, 節足動物 (ダニやトビムシなど) などが考えられた。また, 文化財保存科学ならびに菌類多様性研究に広く寄与することを目的とし, DNA バーコードによる菌類の迅速同定法について検討した結果, *Acremonium* 属 (広義) では ITS と LSU が PCR 増幅および種同定に関して優れ, 高松塚古墳分離株の同定に適用した。 *Cladosporium* 属では *rpb1* が他の遺伝子よりも種同定に優れていた。従って, DNA バーコード標準遺伝子として, *Acremonium* 属 (広義) では ITS と LSU を, *Cladosporium* 属では *rpb1* を提案する。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 安光得, 喜友名朝彦, 木川りか, 佐野千絵, 三浦定俊, 杉山純多 (2008). 高松塚・キトラ古墳から分離した主要な *Penicillium* spp. の分子系統解析法の評価: 菌類 DNA バーコード化に向けて. 日本農芸化学会 2008年度大会

(名古屋).

- 2) 喜友名朝彦, 安光得, 木川りか, 佐野千絵, 三浦定俊, 杉山純多 (2008). 高松塚・キトラ両古墳石室内壁画面に発生した“黒いしみ”の正体. 日本菌学会第52回大会 (三重).
- 3) 安光得, 喜友名朝彦, 杉山純多 (2008). 菌類 DNA バーコード化の背景と将来性. 平成20年度日本菌学会関東支部年次大会 (千葉).
- 4) 安光得, 喜友名朝彦, 富田 (畑) 順子, 中村葵, 下村謙悟, 木川りか, 佐野千絵, 三浦定俊, 杉山純多 (2008). 高松塚古墳石室および石室解体作業中に採取された試料の菌類群集解析. 第24回日本微生物生態学会 (札幌).
- 5) 安光得 (2008). 菌類 DNA バーコード化の現状と展望について. 第18回微生物資源ワークショップ (三島).
- 6) An K. -D., Kiyuna, T., Kigawa, R., Sano, C., Miura, T. & Sugiyama, J. (2009). The identity of *Penicillium* sp. 1, a major contaminant of the stone chambers in the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in the village of Asuka, Nara, Japan, is *Penicillium paneum*. International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies (Seoul, Korea).
- 7) 安光得, 富田順子, 喜友名朝彦, 木川りか, 佐野千絵, 三浦定俊, 杉山純多 (2009). 高松塚古墳石室およびその周辺環境から採取された試料の菌類群集解析. 第25回日本微生物生態学会 (広島).
- 8) An, K. -D., Tomita, J., Kiyuna, T., Kigawa, R., Sano, C., Ohkuma, M. & Sugiyama, J. (2010). Fungal community analysis of the samples collected from the stone chamber and its neighboring environment of the Takamatsuzuka Tumulus in Nara, Japan. 2010 International meeting of the Microbiological Society of Korea (Ulsan, Korea).
- 9) An, K. -D., Tomita, J., Kiyuna, T., Kigawa, R., Sano, C., Ohkuma, M. & Sugiyama, J. (2010). Applications of DGGE and clone library to the fungal community analyses in Takamatsuzuka Tumulus in Nara, Japan. The 9th International Mycological Congress (Edinburgh, UK).

原著論文

- 1) An, K. -D., Kiyuna, T., Kigawa, R., Sano, C., Miura, T. & Sugiyama, J. (2009). The identity of *Penicillium* sp. 1, a major contaminant of the stone chambers in the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan, is *Penicillium paneum*. *Antonie van Leeuwenhoek*. **96**: 579-592.
- 2) Kiyuna, T., An, K. -D., Kigawa, R., Sano, C., Miura, T. & Sugiyama, J. (2011). Molecular assessment of fungi in "black spots" that deface murals in the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan: *Acremonium* sect. *Gliomastix* including *Acremonium tumulicola* sp. nov. and *Acremonium felinum* comb. nov. *Mycoscience* **52**: 1-17.

保存機関に寄託した菌株

本研究により分離した以下の菌株を JCM に寄託した。

学名	JCM 番号
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>masseei</i>	17164
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>masseei</i>	17165
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>masseei</i>	17166
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>masseei</i>	17167
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>masseei</i>	17168
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>masseei</i>	17169
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>masseei</i>	17170
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>masseei</i>	17171
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>murorum</i>	17172
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>murorum</i>	17173
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>murorum</i>	17174
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>murorum</i>	17175
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>murorum</i>	17176
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>murorum</i>	17177
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>felinum</i>	17178
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>polychrorum</i>	17179
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>polychrorum</i>	17180
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>polychrorum</i>	17181
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>tumulicola</i>	17182
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>tumulicola</i>	17183
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) <i>tumulicola</i>	17184
<i>Penicillium paneum</i>	15985
<i>Penicillium paneum</i>	15986
<i>Penicillium paneum</i>	15987
<i>Penicillium paneum</i>	15988
<i>Penicillium paneum</i>	15989
<i>Penicillium paneum</i>	15990
<i>Penicillium paneum</i>	15991
<i>Penicillium paneum</i>	15992
<i>Penicillium paneum</i>	15993
<i>Penicillium paneum</i>	15994
<i>Penicillium paneum</i>	15995

謝 辞

本研究に対し、3年間の助成をいただいた公益財団法人発酵研究所に心から感謝申し上げます。また、貴重な試料の調査研究を許可された文化庁文化財部古墳壁画室の関係者に御礼申し上げます。本研究にご指導とご助言を賜った東京大学名誉教授、(株)テクノスルガ・ラボ学術顧問 杉山純多先生、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室 大熊盛也室

長に心より感謝いたします。

文 献

- An, K. -D., Nishida, H., Miura, Y. & Yokota, A. (2002). Aminoacidate reductase gene: a new fungal-specific gene for comparative evolutionary analyses. *BMC Biol.Evol.* **2**: 6.
- An, K. -D., Kiyuna, T., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S. & Sugiyama, J. (2009). The identity of *Penicillium* sp. 1, a major contaminant of the stone chambers in the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan, is *Penicillium paneum*. *Antonie. van Leeuwenhoek.* **96**: 579-592.
- Arai, H. (1984). Microbiological studies on the conservation of mural paintings in tumuli, *In* Ito, N., Emoto, Y. & Miura, S. (eds.), International Symposium on the Conservation and Restoration of Cultural Property - Conservation and Restoration of Mural Paintings (1), p. 117-124, Tokyo National Institute of Cultural Properties, Tokyo.
- 新井英夫. (1987). 高松塚古墳壁画の微生物学的環境とその対策, 文化庁 (編集), 国宝 高松塚古墳壁画 - 保存と修理 -, p. 186-196, 文化庁, 東京.
- 新井英夫. (1990). 文化財の生物劣化とその防除に関する研究. 東京国立文化財研究所, 東京.
- Dromph, K. M. (2003). Collembolans as vectors of entomopathogenic fungi. *Pedobiologia* **47**: 245-256.
- Gams, W. (1971). *Cephalosporium*-artige Schimmelpilze (Hyphomycetes). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Glass, N. L. & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 41323-41330.
- Greif, M. D. & Currah, R. S. (2007). Patterns in the occurrence of saprophytic fungi carried by arthropods caught in traps baited with rotted wood and dung. *Mycologia* **99**: 7-19.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcoding. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **270**: 313-321.
- 木川りか, 佐野千絵, 石崎武志, 三浦定俊. (2006). 高松塚古墳の微生物対策の経緯と現状. *保存科学* **45**: 33-58.
- 木川りか (2009). 高松塚古墳の劣化や汚染に関与した微生物について. 高松塚古墳壁画劣化原因調査検討会 (第12回) 資料4, p. 1-5.
[http://www.bunka.go.jp/takamatsu_kitora/kentokaito/rekkachosa/12/pdf/shiryu_4.pdf].
- Kigawa, R., Sano, C., Ishizaki, T., Miura, S. & Sugiyama J. (2009). Biological issues in the conservation of mural paintings of Takamatsuzuka and Kitora tumuli in Japan. *In* Sano, C. (ed), International Symposium on the Conservation and Restoration of Cultural Property: Study of Environmental Conditions Surrounding Cultural Properties and Their Protective Measures, p. 43-50, National Research Institute for Cultural Properties, Tokyo.

- 木川りか, 杉山純多, 高島 浩介, 佐野千絵, 石崎武志, 三浦定俊. (2010). 高松塚古墳壁画の保存対策, 4. 高松塚古墳壁画の生物被害と保存対策. 地盤工学会誌 **58**: 48-55.
- Kiyuna, T., An, K. -D., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S. & Sugiyama, J. (2008). Mycobiota of the Takamatsuzuka and Kitora tumuli in Japan, focusing on the molecular phylogenetic diversity of *Fusarium* and *Trichoderma*. *Mycoscience* **49**: 298-311.
- Kiyuna, T., An, K. -D., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S. & Sugiyama, J. (2011). Molecular assessment of fungi in "black spots" that deface murals in the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan: *Acremonium* sect. *Gliomastix* including *Acremonium tumulicola* sp. nov. and *Acremonium felinum* comb. nov. *Mycoscience* **52**: 1-17.
- Kress, W., J. & Erickson, D., L. (2008). DNA barcodes: Genes, genomics, and bioinformatics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 2761-2762.
- Matheny, P. B., Liu, Y. J., Ammirati, J. F. & Hall, B. D. (2002). Using RPB1 sequences to improve phylogenetic inference among mushrooms (*Inocybe*, Agaricales). *Am. J. Bot.* **89**: 688-698.
- Mitchell, J. I. & Zuccaro, A. (2006). Sequences, the environment and fungi. *Mycologist* **20**: 62-74.
- Nagatsuka, Y., Kiyuna, T., Kigawa, R., Sano, C., Miura, S. & Sugiyama, J. (2009). *Candida tumulicola* sp. nov. and *Candida takamatsuzukensis* sp. nov., novel yeast species assignable to the *Candida membranifaciens* clade, isolated from the stone chamber of the Takamatsuzuka tumulus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 186-194.
- O'Donnell, K. (1993). *Fusarium* and its near relatives. In Reynolds, D. R. & Taylor, J. W. (eds.), *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematic*. p. 225-233, CAB International, Wallingford.
- Rossmann, A. Y. (2007). Report of the Planning Workshop for All Fungi DNA Barcoding. *Inoculum* **58**: 1-5.
- Schmitt, I., Crespo, A., Divakar, P. K., Fankhauser, J. D., Herman-Sackett, E., Kalb, K., Nelsen, M. P., Nelson, N. A., Rivas-Plata, E., Shimp, A. D., Widhelm, T. & Lumbsch, H. T. (2009). New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. *Persoonia* **23**: 35-40.
- Stiller, J.W. & Hall, B.D. (1997). The origin of red algae: Implications for plastid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4520-4525.
- Sugiyama, J., Kiyuna, T., An, K. -D., Koide, T., Kigawa, R., Sano, C. & Miura, S. (2008). Microbiological survey of the stone chambers of Takamatsuzuka and Kitora tumuli, Nara Prefecture, Japan: a milestone in elucidating the cause of biodeterioration of mural paintings. p. 34-36, 31st International Symposium on the Conservation and Restoration of Cultural Property, Tokyo [Abstracts].
- 杉山純多, 木川りか, 佐野千絵 (2009). 高松塚古墳石室内外環境の菌類調査報告. 高松塚古墳壁画劣化原因調査検討会 (第12回), 参考資料1-1, p. 1-13.
[http://www.bunka.go.jp/takamatsu_kitora/kentokaito/rekkachosa/12/pdf/sanko_1_1.pdf].
- Sugiyama, J., Kiyuna, T., An, K. -D., Nagatsuka, Y., Handa, Y., Tazato, N., Hata-Tomita, J., Nishijima, M., Koide, T., Yaguchi, Y., Kigawa, R., Sano, C. & Miura, S. (2009). Microbiological survey of the stone chambers of Takamatsuzuka and Kitora tumuli, Nara Prefecture, Japan: a milestone in elucidating the cause of biodeterioration of mural paintings. In Sano, C. (ed.), *International Symposium on the Conservation and Restoration of Cultural Property - Study of Environmental Conditions Surrounding Cultural Properties and Their Protective Measures*, p 51-73, National Research Institute for Cultural Properties, Tokyo.
- 高松塚古墳壁画劣化原因調査検討会 (2010). 高松塚古墳壁画劣化原因調査報告書. p. 106.
[http://www.bunka.go.jp/takamatsu_kitora/kentokaito/pdf/rekka_houkokusho_ver02.pdf].
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596-1599.
- 建石 徹, 渡辺丈彦, 宇田川滋正 (2010). 高松塚古墳の概要および保存・管理の経緯と現状. 地盤工学会誌 **58**: 54-61.
- Van Hanne, E. J., van Agterveld, M. P., Gons, H. J. & Laanbroek, H. J. (1998). Revealing eukaryotic genetic diversity in aquatic environments by denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Phycol.* **34**: 206-213.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. p. 315-322, Academic Press, San Diego.

微細藻類と共存して培養される難培養細菌の継代培養法 および系統分類に関する研究

大塚 重人

東京大学・大学院農学生命科学研究科

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1

The cultivation and phylogeny of "uncultivable" bacteria co-cultivated with microalgae

Shigeto Otsuka

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo,
1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

In the present study, artificial green microalgal-bacterial consortia were established by inoculating soil with an axenic strain of *Chlorella vulgaris* NIES-227. These consortia were maintained in an inorganic medium in the light for periods from seven weeks to more than a year, and the bacterial community structure co-cultivated in them was examined by a cultivation-independent PCR-based method. Bacteria belonging to the phyla *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* were dominant members in the consortia, and those belonging to the phyla *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, and *Verrucomicrobia* were also detected in small proportions. Subsequently, bacteria in the consortia were cultivated and isolated on gel plate media containing *C. vulgaris* NIES-227, and the composition of these isolates was also examined. Members of the phylum *Proteobacteria* comprised the majority among the isolates. No isolate belonged to the phylum *Acidobacteria*, and only a small part of the PCR-detected bacteria belonging to the phyla *Bacteroidetes* and *Actinobacteria* were isolated. Bacteria belonging to the genus *Prostheco bacter* and closely related to the genus *Verrucomicrobium*, both belonging to the phylum *Verrucomicrobia*, were isolated. The above isolates included candidates for novel species, a part of which would belong to novel genera or taxa of higher rank. Most of the isolates could grow on R2A medium and thus do not necessarily require an algal partner to live under cultivation. There were still many DNA sequence-based taxa left unisolated from the consortia. These so-called "uncultivable bacteria" (or "unculturable bacteria") are currently being maintained under co-cultivation with *C. vulgaris* NIES-227.

Key words: algae, bacteria, co-cultivation, community composition, cultivability

緒 言

環境中の細菌の大部分は既存の培養法では培養されない「難培養細菌」であると考えられている (Torsvik *et al.*, 1996; 太田, 2003). 細菌の分離・培養法の選択肢を増やし、難培養とされてきた細菌を培養できるようになれば、新たな細菌資源の獲得や細菌の生態解明につながると期待される。これまでに、培養の物理的条件や化学的条件を改変することによって、それまでに知られて

いなかった様々な細菌が培養されるようになっている。たとえば、深海から分離された好圧性細菌 *Moritella profunda* や *Moritella abyssi* は、海水を模した無機成分組成からなる培地中で、低温、高圧条件下で培養が可能である (Xu *et al.*, 2003)。また、培地の pH を高く設定することにより、好アルカリ性細菌 *Alkaliphilus transvaalensis* が培養された (Takai *et al.*, 2001)。これらの細菌は、極端な生育環境を再現することにより培養されたものである。一方、極限環境下でない土壌や水圏などからより多くの細菌を分離培養しようという試みもある。たとえば、Sait *et al.* (2002) は培地中の炭素源としてキシランを用いることにより、多くの新規細菌

の単離に成功した。ほかにも、平板培地のゲル化剤を寒天からゲランガムに変えることにより、コロニー形成数が増大するという報告がある (Janssen *et al.*, 2002)。微生物は多くの場合、環境中において単独で生活しておらず、微生物を含む他の生物とさまざまな相互作用をしていると考えられる。これを培養に利用した例として、二者培養により好熱性 *Bacillus* 属細菌の共生細菌である *Symbiobacterium thermophilum* が純粋培養株として分離・培養されている (Ueda *et al.*, 2004)。しかし、このような生物的要素に注目した培養法の研究例は少ない。

Bell & Mitchell (1972) および Bell *et al.* (1974) によると、海洋などの水圏では、微細藻類は光合成によって生産した低分子有機物 (糖類, アミノ酸) の 5~30% を藻体外に溶存体有機物として排出しており (体外排出有機物 extracellular organic carbon: EOC), この EOC に対する細菌種ごとの反応の差異によって、陸生環境下の根圏 (rhizosphere) のように、藻類の分泌物の影響を受ける “phycosphere” が形成されていると言う。実際、培養に依存しない解析法により、海洋性の珪藻や渦鞭毛藻の培養液中に、一定の傾向を持った細菌群集構造が形成されていることが示されている (Sapp *et al.*, 2007)。このような微細藻類の培養株から *Bacteroidetes* 門の新規細菌が分離された例はあるが (Nedashkovskaya *et al.*, 2005), 微細藻類を難培養細菌の培養に直接利用しようという研究はなかった。

微細藻類の主要な生息環境は水圏であり、水圏における微細藻類と細菌の相互作用に関する研究は少なからずある (Cole, 1982; Croft *et al.*, 2005 など)。一方、土壌にも主に表層に緑藻や珪藻などが生息しているが、土壌の微細藻類と細菌の相互作用に関する研究はほとんどなく、土壌を含む様々な環境に由来する微細藻類の分泌物が、一般的な培養細菌の生育に与える影響について報告されている程度である (Safonova & Reisser, 2005)。しかし、水圏における微細藻類と細菌のような関係が、土壌中の、あるいは土壌に由来する微細藻類と細菌にも当てはまる可能性はある。本研究に先駆けて、著者らは、土壌から微細緑藻を分離し無菌化せずに培養を続けると、培養液中に難培養と考えられる細菌が共存して培養されることを報告した (Otsuka *et al.*, 2008a)。このような細菌は、土壌中でも緑藻の分泌物を利用して可能性もあるが、土壌中では植物根からの分泌物や植物遺体の分解産物として供給される有機物を利用しており、それと同じような物質を緑藻が培養液中に分泌している可能性もある。いずれにせよ、野外においては微細藻類と緊密な共生関係にない細菌であっても、野外から切り取られた培養器の中においては微細

藻類の分泌物に依存して生育するものが確実に存在し、それを利用して、難培養とされてきた細菌を継代培養できる可能性がある。

本研究は、微細藻類と共存させることによって土壌由来の難培養細菌を培養することを目的とした。得られた難培養細菌を研究材料として利用するためには、その細菌が他の生物と混合していない状態で培養されていることが重要である。また、難培養細菌には系統的に新規性の高いものが多いと推測され、将来的には新種として国際原核生物命名規約に基づいて記載することも必要になるが、そのためにも純粋株であることが必要である。よって、藻類と共存して培養される細菌であっても、将来的には藻類から切り離しても培養され得ることが求められる。これらを達成するため、微細緑藻 *Chlorella vulgaris* NIES-227 純粋培養株を用いて、以下の実験を行った。

まず、*C. vulgaris* NIES-227 株の培養液に土壌を直接接種し、それらを混合状態で培養した (混合培養系)。培養液中に形成される細菌の群集組成を解析し、難培養と考えられる細菌が集積されるかどうか検討した。

次に、孔径 0.2 μ m のメンブレンフィルターで二槽に隔てられた無機液体培地中で、*C. vulgaris* NIES-227 株と土壌由来の細菌を隔離しつつ共存させて培養した (二槽培養系)。形成される群集組成を解析し、難培養と考えられる細菌が *C. vulgaris* NIES-227 株と接触せずとも培養されるかどうか検討した。

最後に、多様な細菌を含む共存細菌群から単クローン細菌を分離し、*C. vulgaris* NIES-227 株と分離細菌 1 株のみを含む培養系の確立を試みた。また、*C. vulgaris* NIES-227 株を混合した無機平板培地および汎用の栄養平板培地を用いて、どのような細菌が分離されるか試験した。

実験方法

緑藻-細菌混合培養系の構築 東京大学農学部弥生圃場 (不作付畑) から表層部の A 層土壌を採取し、滅菌水に懸濁した。これを希釈して後述する細菌接種源とした。

国立環境研究所微生物系統保存施設 (NIES コレクション) から緑藻 *C. vulgaris* NIES-227 株の純粋培養株の分譲を受けた。この NIES-227 株を、C 液体培地 (Ichimura, 1971) を用い、グロースチャンパー MLR-351 (SANYO, 大阪) 内にて、25 $^{\circ}$ C、照度約 3000 Lx、16 時間、および、20 $^{\circ}$ C、照度 0 Lx、8 時間の明暗周期で継代培養した。この NIES-227 株の培養液約 10 ml に、上述の土壌懸濁希釈液 1 ml を接種した。以後、これを混

混合培養系と呼ぶ。また、コントロールとして、NIES-227株を含まないC液体培地10mlにも土壌懸濁希釈液を接種した。これら混合培養系およびコントロールを、NIES-227株の培養条件(上述)で培養した。

混合培養系の細菌組成解析 7週間の培養の後、培養液を遠心濃縮して2 μ lずつ回収し、それをテンプレートDNAの代わりにそのまま使用し、全容30 μ lで、16S rRNA遺伝子のほぼ全長をターゲットとしたPCR反応を行った。用いたプライマーは27F(5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3')および1492R(5'-GGCTA CCTTGTTACGACTT-3')である。反応サイクルは、まず94 $^{\circ}$ Cの熱変性を5分行った後、94 $^{\circ}$ C(熱変性)30秒、55 $^{\circ}$ C(アニーリング)30秒、および72 $^{\circ}$ C(伸長)45秒からなる反応を27サイクル行い、最後に72 $^{\circ}$ Cの伸長反応を7分加えた(以上、PCR1回目)。PCR反応後、MicroSpin S-400 HR(GE Health Care, 東京)を用いて余剰のプライマーを除去した。

このプライマー除去済みのPCR産物をテンプレートとし、プライマー357F(5'-CCTACGGGAGGCAG CAG-3')と520R(5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3')を用いて16S rRNA遺伝子の可変領域3(V3領域)をPCR増幅した。変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)に供試するため、プライマー357Fの5'側にGCクランプ(5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGG GGGCACGGGGG-3')(Muyzer *et al.*, 1993)を付加した。PCR反応液は全量を50 μ lとし、PCRサイクルは、まず94 $^{\circ}$ Cの熱変性を5分行った後、94 $^{\circ}$ C(熱変性)30秒、55 $^{\circ}$ C(アニーリング)30秒、および72 $^{\circ}$ C(伸長)1分からなる反応を27サイクル行い、最後に72 $^{\circ}$ Cの伸長反応を7分加えた(以上、PCR2回目)。Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega, 東京)を用いてPCR産物からプライマーを除去し、ND-1000 UV/Vis Spectrophotometer(NanoDrop Technologies, U.S.A)を用いてDNA濃度を測定した。約750ngのPCR産物を、変性剤濃度30~60%で作成した6%ポリアクリルアミドゲルにて、60 $^{\circ}$ C、60Vで14時間電気泳動した。泳動後、サイバークリーンで染色しUV光の下でDNAバンドを確認した。DNAバンド確認後、検出されたバンドを含むゲルを切り出し、1.5mlチューブに移して滅菌水50 μ lを加えた。それを-80 $^{\circ}$ Cに1時間置いて凍らせた後、4 $^{\circ}$ Cの冷蔵庫に移し1時間静置した。この凍結融解を2回繰り返し、DNAを溶出させた。

このように回収されたDNA(PCR産物)にはGCクランプが付いている。GCクランプのないPCR産物を得るために、回収されたPCR産物をテンプレートとし

て、GCクランプのないプライマー357Fと520R(上述)を用い、PCR2回目と同じ条件で再度PCRを行った。MicroSpin S-400 HR(GE Health Care)を用いてPCR産物からプライマーを除去し、p-GEM T Easy Vector Systems(Promega, Madison, WI, USA)を用い、添付のプロトコルに従ってTAクローニングを行った。青白コロニー色選別にてPCR産物が挿入されたプラスミドを持つと判断された大腸菌のコロニーを1本のDGGEバンドにつきランダムに5~10個選び、その塩基配列を解読した。解読は、ベクターの領域をターゲットとしたV-2772F(5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3')およびV-172R(5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3')を用い、タカラドラゴンジェノミクスへの委託により行った。

National Center for Biotechnology Information(NCBI)が提供するblast(Altschul *et al.*, 1990)および、Ribosomal Database Project IIが提供するSeqMatch(Cole *et al.*, 2007)およびNaïve Bayesian rRNA classifier(Wang *et al.*, 2007)を利用し、得られた塩基配列と相同性の高い塩基配列情報の収集と所属分類群の推定を行った。また解読した塩基配列に近縁種細菌や参照となる細菌の塩基配列を加え、ClustalX 1.8.3(Thompson *et al.*, 1997)を用いて近隣結合法による系統解析を行い、検出された細菌の所属分類群を同定した。

細菌の分画および組成解析 上述の混合培養系を、培養開始7週間後に新しいC液体培地に植え継ぎ、その後3週間おきに植え継ぎを行って継代した。培養開始から約60週後、1本の試験管の培養液から3本の試験管に植え継ぎ、さらに3週間培養したものをを用いて、以下の処理を行った。まず、培養液7mlを孔径3 μ mおよび0.2 μ mのメンブレンフィルター(Mixed Cellulose Ester)(ADVANTEC)で順次濾過した。細胞の直径が5 μ m以上である*C. vulgaris* NIES-227株の藻体およびそれに付着する細菌は孔径3 μ mのメンブレンフィルターに、藻体に付着していない細菌はそれを通り抜け孔径0.2 μ mのメンブレンフィルターに捕足されていると考えられた。それぞれのフィルターをビーカーに移し、滅菌水5mlを加えて、BRANSON 3210(ヤマト機器, 東京)にて7分間超音波処理し、フィルター上の藻体および細菌をはがした。この溶液を15ml容遠心チューブに移し、20,000 \times gで15分間遠心し、上清を捨てた。この残った培養液の一部を試料とし、上述の方法によって、それぞれの画分に含まれる細菌の組成を解析した。

二槽培養系の構築 孔径0.2 μ mのメンブレンフィ

ルターで仕切られた二槽培養器 (バイオット, 東京) (Fig. 1A) に滅菌した液体 C 培地 100 ml (一槽に 50 ml ずつ) を満たし, 一方に *C. vulgaris* NIES-227 株の純粋培養液 2 ml を, 他方に上述の土壤懸濁希釈液 1 ml を接種し, 二槽培養系とした (以後, 前者を藻類槽, 後者を細菌槽と呼ぶ). これを 1 連 (実験 1 回目) および 3 連 (実験 2 回目) でつくり, NIES-227 株の培養条件 (上述) で培養した.

二槽培養系の細菌組成解析 実験 1 回目では, 培養開始 7 週間後に細菌槽の培養液を 3 ml 回収した. 実験 2 回目では, 細菌組成の経時変化を追跡するため, 培養開始から 6 週間後まで 1 週間ごとに計 6 回, 細菌槽の培養液を 3 ml ずつ回収した. 培養液を遠心濃縮して 2 μ l ずつ回収し, それをテンプレート DNA の代わりにそのまま使用し, 全容 30 μ l で, 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長をターゲットとした PCR 反応を行った. 用いたプライマーおよび PCR のサイクルは上述 (PCR 1 回目) と同一である. その後, プライマー除去, PCR (2 回目), DGGE, DNA 回収, クローニング, 塩基配列解読, および系統解析を上述の方法にて行った.

藻類混合無機平板培地の作製 無機培地である C 培地を調製し, 0.8% (w/v) 相当のアガロースまたは 1% (w/v) 相当のゲランガムを加えオートクレーブした後, ウォータバスを利用して 0.8% アガロースまたは 1% ゲランガム が固化しない温度, すなわち 35~40°C に保った. この C 培地 200 ml に *C. vulgaris* NIES-227 純粋培養株の培養液 5 ml を混合し, シャーレに分注してから室温にて固化し, *C. vulgaris* NIES-227 の培養条件 (上述) と同様の条件下でグロースチャンパー内にて培養した. 本報文中では, この培地を「藻類混合無機平板培地」と呼ぶ.

二槽培養系細菌槽からの細菌の分離 藻類混合無機平板培地の内部で *C. vulgaris* NIES-227 が増殖し, 培地が緑色になってきたら, 植え継ぎから 6 週間以上経過した二槽培養系細菌槽の培養液を希釈して培地表面に接種した. 生じたコロニーを 1 つずつ分離し, 別途作成した新鮮な藻類混合無機平板培地および, 1/10 倍および 1/100 倍濃度の Nutrient Broth (以後 1/10 NB および 1/100 NB と表記する) の 0.8% アガロースまたは 1% ゲランガム平板培地に植え継いで培養した. これにより, 株の純化と継代を行い, また汎用栄養培地 (1/10 NB および 1/100 NB 培地) 上での生育の有無を判定した.

分離株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解読 上述のように分離された細菌のうち, 1/10 NB および 1/100 NB 平板培地でもコロニーを形成した細菌は, シングルコロニーの懸濁液をテンプレート DNA の代わりにそのまま用い, PCR により 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を増幅し, 上述の方法で塩基配列を解読した. ただし, PCR 産物は, クローニングを経ずに塩基配列解読に直接供した. また, 藻類混合無機平板培地でのみコロニーを形成した細菌は, シングルコロニーを取り出しても *C. vulgaris* NIES-227 株の混入の可能性があるため, 16S rRNA 遺伝子ほぼ全長のコロニー PCR 産物を, まず p-GEM T Easy Vector Systems (Promega) を用いてクローニングし, その後塩基配列を解読した. それらの塩基配列に基づき, 上述と同様にして相同性検索や系統解析を行い, 分離細菌株を同定した. なお, 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を増幅するための PCR の反応サイクルは, まず 94°C の熱変性を 5 分行った後, 94°C (熱変性) 30 秒, 55°C (アニーリング) 30 秒, および 72°C (伸長) 45 秒からなる反応を 30 サイクル行い, 最後に 72°C の伸長反応を 7 分加えた.

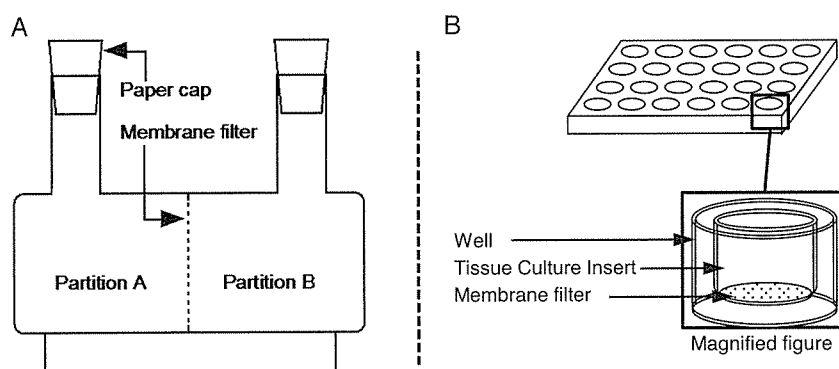


Fig. 1 A dialysing culture vessel (left) and a "mini-scale dialysing culture vessel" established on a 24-well plate (right), each separated into two partitions by a 0.2- μ m membrane filter.

プレート式二槽培養系の構築 コロニー形成能を持たない細菌の存在の可能性を考慮し、単一クローンの細菌と *C. vulgaris* NIES-227 株による二槽培養系の確立を目的として、二槽培養系細菌槽の培養液の希釈液を接種源とし、新たに二槽培養系を構築した。作業の効率化のため、ミニスケールの二槽培養系の作成を以下のように試みた。まず、24ウェルからなる Cell Culture Plate (Nalge Nunc International K. K., 東京) の各ウェルに滅菌 C 培地を 600 μ l ずつ分注した。継代していた3連の二槽培養系(上述)のうち2つの細菌槽の培養液を適宜希釈し、5 μ l ずつ各ウェルに接種した。各ウェルに孔径 0.2 μ m の Anopore メンブレンフィルターのついた Tissue Culture Insert (Nalge Nunc International K. K., 東京) を装着し、各 Insert 内に滅菌 C 培地を 600 μ l ずつ分注してから、*C. vulgaris* NIES-227 株の無菌株の培養液 15 μ l を植え継ぎ、*C. vulgaris* NIES-227 株の培養条件(上述)と同様の条件下で培養した。これをプレート式二槽培養系と呼び、ウェルの内部でインサートの外側を細菌槽、インサートの内側を藻類槽と呼ぶことにする (Fig. 1B 参照)。

プレート式二槽培養系の細菌組成解析 単一クローンの細菌と *C. vulgaris* NIES-227 から成る二槽培養系ができあがったかどうか確認するため、まずプレート式二槽培養系細菌槽の細菌組成を解析した。すなわち、プレート式二槽培養系の培養開始から約3週間後に、細菌槽の培養液をテンプレートとして細菌槽に含まれる細菌群の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長をターゲットとした PCR を行った。続いてプライマー除去、DGGE、バンドの切り出し、クローニング、塩基配列解読、および系統解析を行った。これらの手法は二槽培養系の細菌組成解析(上述)と同様である。

混合培養系より分離された *Ensifer* sp. CSBa 株のビタミン B₁₂ (コバラミン) 合成系遺伝子の同定 本研究と平行して、著者の研究グループは微細緑藻と細菌との相互作用に関する研究を行っていた。その研究の中で、本研究の手法を応用し、また本研究の混合培養系を分離源として、ビタミン B₁₂ (コバラミン) 要求性の藻類と土壌由来の細菌分離株とを、無機培地中にて混合培養することにより、コバラミン生産細菌のスクリーニングを行った。その研究で得られたコバラミン生産細菌 *Ensifer* sp. CSBa 株を材料として、本 IFO 研究助成によりコバラミン合成系遺伝子を以下のように同定した。

まず、*Ensifer* sp. CSBa 株のゲノム DNA のドラフト解析を、北海道システム・サイエンスへの委託により行った。すなわち、30 μ g の精製 DNA を 454 GS-FLX

(Roche) を用いたパイロシーケンシングに供し、575,172 塩基配列 (計225,813,225 bp) が得られた。次に、GS De novo Assembler Software によりアセンブリングを行い、76コンティグが生成された。各コンティグの配列上の開始/終止コドンを MetaGene Annotater により検出し、6,859 オープンリーディングフレーム (open reading frames) を得た。最後に、その推定アミノ酸配列を blastp による相同性検索に供し、コバラミン合成系遺伝子の相同遺伝子を検索した。

結果

混合培養系およびコントロール中の細菌群集構造 混合培養系およびコントロール中に形成された細菌群集構造を表す 16S rRNA 遺伝子-V3 領域の DGGE パターンを、後述する二槽培養系(実験1回目)の DGGE パターンと合わせて Fig. 2 に示す。これらは、同じ接種源を同時に接種して培養したものである。写真では分かりにくいですが、強度の大きなバンドの他に、多数の強度の小さなバンドが認められた。混合培養系由来 (Fig. 2 の MC) のバンド9および11のように、混合培養系のみ強く現れコントロールには現れないバンドもあれば、バンド13 (= 15) のように混合培養系のみならずコントロールにも大きな強度をもって現れるバンドもあった。また、コントロール由来 (Fig. 2 の CC) のバンド14や16のように、コントロールのみ強く表れるバンドもあった。細菌群集の分類構成を調べるために、Fig. 2 に示された DGGE バンドの塩基配列を解読し、SeqMatch に

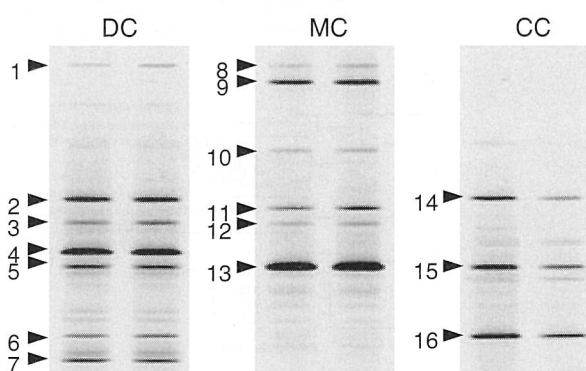


Fig. 2 DGGE banding patterns of bacteria in the separate culture in a dialysing culture vessel (DC), the mixed culture in a glass tube (MC), and the control culture in a tube (CC) after 7-week cultivation. The bacteria were co-cultivated with *C. vulgaris* NIES-227 in the former two cultures. The bands indicated by arrows were excised, cloned, and sequenced (cf. Fig. 3).

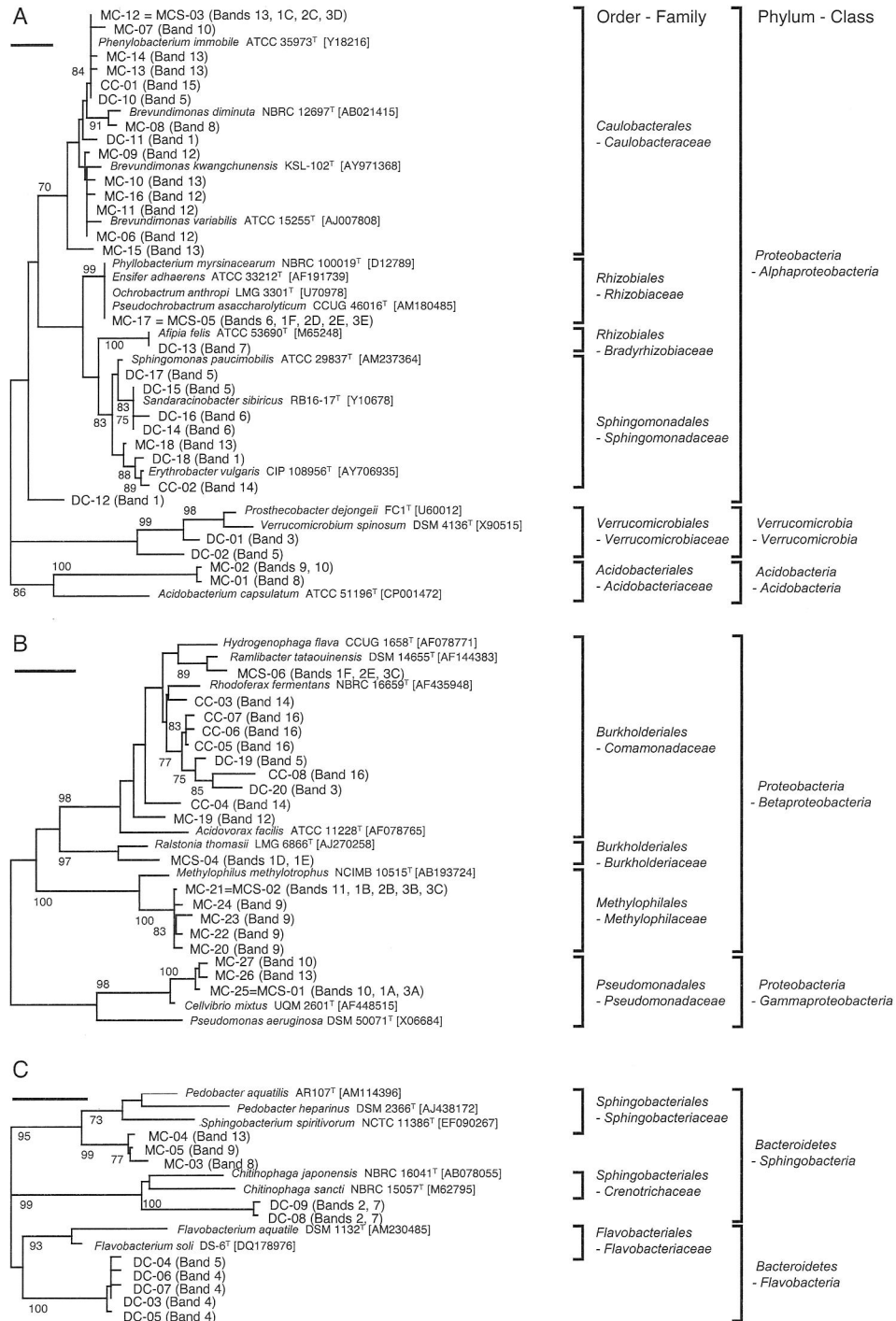


Fig. 3 Neighbour-joining (NJ) trees based on the sequence of the V3 region of the 16S rDNA, including the bacteria detected in the cultures and the type strains of the phylogenetically related bacteria. Depending on the length of the sequenced region between the primers, NJ trees were calculated separately for the following three groups: A, *Alphaproteobacteria*, *Acidobacteria* and *Verrucomicrobia* (all 135 bp in length); B, *Beta-* and *Gammaproteobacteria* (mostly 160 bp) and C, *Bacteroidetes* (mostly 155 bp). The names of the taxonomic units beginning with DC, MC, and CC denote the sequences detected in the separate, the mixed, and the control cultures, respectively. Names with MC1S denote those from the long-term mixed cultures. The number(s) following a sequence name denotes the DGGE band(s) from which the sequence(s) was obtained. Bootstrap values (%) were generated from 1000 replicates and values only $\geq 70\%$ are shown. Scale bars indicate 0.05 nucleotide substitutions per site.

よって算出された S_{ab} score に基づいて、解読された塩基配列の持ち主と最も近縁と考えられる既記載種細菌のタイプ株を特定した。そのタイプ株や、近縁分類群のタイプ株を加えて作成した近隣結合系統樹を Fig. 3 に示す。

混合培養系からは、主に *Proteobacteria* 門、次いで *Bacteroidetes* 門に属すると考えられる細菌が検出され、*Acidobacteria* 門細菌も検出された (Fig. 3 参照)。 *Bacteroidetes* 門細菌に由来する塩基配列と、その最近

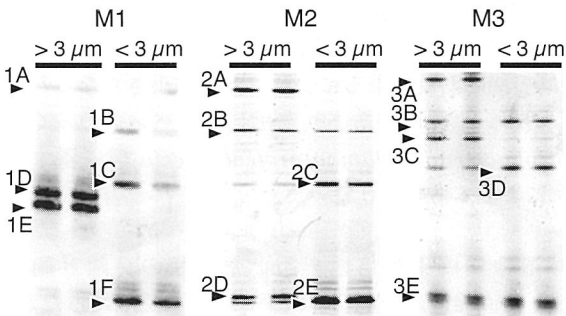


Fig. 4 DGGE banding patterns of bacteria harvested from the fractions $>3\mu\text{m}$ and $<3\mu\text{m}$ of the long-term mixed cultures after 15-month co-cultivation in triplicate (assigned as M1, M2, and M3 in this figure). The bands indicated by arrows were excised, cloned, and sequenced (cf. Fig. 3).

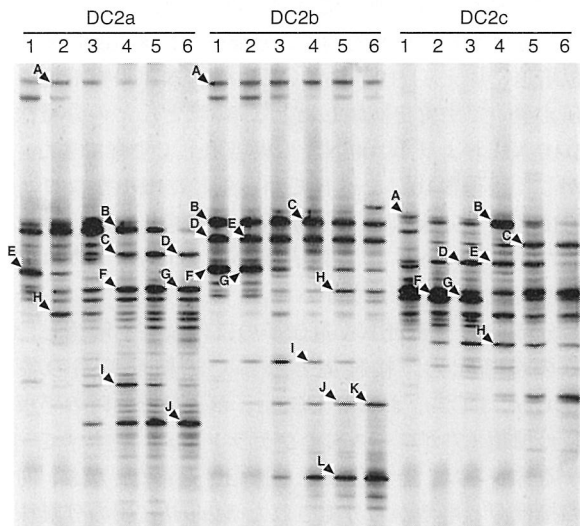


Fig. 5 DGGE banding patterns of bacteria co-cultivated with *C. vulgaris* NIES-227 in the separate cultures in dialysing culture vessels (as the second cultivation examination in triplicate, DC2a, DC2b, and DC2c). The number above each lane indicates the number of weeks after the cultivations started. The bands indicated by arrows were excised, cloned, and sequenced (cf. Table. 1).

縁細菌 (*Pedobacter* 属) タイプ株の該当 DNA 領域塩基配列との相同性は、いずれも低かった (94% 未満)。

Proteobacteria 門 *Betaproteobacteria* 綱細菌に由来する塩基配列と、その最近縁細菌 (*Methylophilus* 属) タイプ株の該当 DNA 領域塩基配列との相同性も低かった (95% 未満)。一方、*Proteobacteria* 門の *Alphaproteobacteria* 綱および *Gammaproteobacteria* 綱の細菌に由来する塩基配列と、それらの最近縁細菌 (*Brevundimonas* 属、*Phenylobacterium* 属、*Cellvibrio* 属等) のタイプ株の該当 DNA 領域塩基配列との相同性はおおむね高かった (多くは 98% 以上)。今回のコントロールから検出されたのは、*Proteobacteria* 門に属すると考えられる細菌だけだった (Fig. 3 参照)。そのうち、*Phenylobacterium* 属細菌に由来すると考えられる塩基配列 CC1-01 は、混合培養系から検出された塩基配列 MC1-13 と同一だった。

長期混合培養系の細菌の分画 長期 (15ヶ月) 混合培養系 M1, M2, および M3 の培養液の、 $3\mu\text{m}$ 以上の画分および $3\mu\text{m}$ 以下かつ $0.2\mu\text{m}$ 以上の画分に由来する菌体の 16S rRNA 遺伝子 V3-DGGE パターンを Fig. 4 に示す。なお、*C. vulgaris* NIES-227 は $3\mu\text{m}$ 以上の画分に含まれるが、*C. vulgaris* NIES-227 の葉緑体由来のバンドは検出されなかった。本研究では DNA 抽出を行わず藻体と菌体の懸濁液をそのままテンプレート DNA の代わりに PCR に供したが、その条件では *C. vulgaris* NIES-227 の藻体が破壊されなかったためと考えられる。 $3\mu\text{m}$ 以上の画分のみから強く検出されたバンド、混合培養系 $3\mu\text{m}$ 以下の画分の方により強く現れたバンドがあった。これらのバンドを構成する DNA の塩基配列の系統的な位置づけは、Fig. 3 の系統樹に示されている。

$3\mu\text{m}$ 以上の画分からは、*Proteobacteria* 門に属する細菌のみが検出された。培養開始から 7 週間後の混合培養系およびコントロールから検出された *Phenylobacterium* 属細菌のものと考えられる塩基配列と 100% 相同な塩基配列も含まれていた。 $3\mu\text{m}$ 以下 $0.2\mu\text{m}$ 以上の画分からは、*Proteobacteria* 門に加えて *Bacteroidetes* 門に属する細菌が検出された。DGGE パターン (Fig. 4) における強度の大きなバンドの主要な構成員のうち、 $3\mu\text{m}$ 以上の画分のみから検出されたのは、*Betaproteobacteria* 綱の *Ralstonia* 属および *Gammaproteobacteria* 綱の *Cellvibrio* 属の細菌だけだった。なお、*Ralstonia* 属細菌は $3\mu\text{m}$ 以下 $0.2\mu\text{m}$ 以上の画分からも、強度の小さなバンドの構成員として検出されているが、そのバンドの主要な構成員ではない。

二槽培養系細菌槽の細菌組成 二槽培養系の細菌槽

の培養液中に形成された細菌群集構造を表す 16S rRNA 遺伝子 V3-DGGE パターン (培養 1 回目) は、上述の通り Fig. 2 に示されている。Fig. 2 の混合培養系 (MC) およびコントロール (CC) は、同じ接種源を同時に接種して培養したものである。強度の大きなバンドの中には、バンド 2 や 4 のように、二槽培養系にのみ明瞭に現れ、混合培養系やコントロールには現れないものもあれば、バンド 5 のように、混合培養系やコントロールにおいても同じ泳動距離を示すバンドが存在するものもあった。また、混合培養系 (MC) の上流には強度の大きいバンド 9 があるが、同じ泳動距離のバンドは二槽培養系には出現しなかった。

さらに、同一の接種源と *C. vulgaris* NIES-227 株から、独立した 3 つの二槽培養系を構築した (培養 2 回目)。以後これらの二槽培養系を、DC2a, DC2b, および DC2c と呼ぶ。すべて同一条件下で培養したが、DC2a, DC2b, および DC2c の細菌槽に由来する DGGE パターンは、それぞれ異なっていた (Fig. 5)。DC2a の DGGE パターンにおけるバンド F および G, DC2b におけるバンド J, K および L のように、培養期間が長くなるのに応じてバンドの強度が大きくなるものがあった。一方、DC2a におけるバンド B および E, DC2b におけるバンド F および G のように、バンドの強度が徐々に小さくなるものや、DC2b におけるバンド B および D のように、培養期間内でバンド強度が変わらないものもあった。

細菌組成を調べるために、Fig. 5 にアルファベットで示された DGGE バンドについて、塩基配列解読と系統解析を経て所属分類群を推定した。その結果を Table 1 に示す。培養 1 回目と同様に、*Bacteroidetes* 門または *Proteobacteria* 門に属すると考えられる細菌が多く検出された。*Verrucomicrobia* 門に属すると考えられる細菌も検出されたが (塩基配列 DC2a-10)、単独で強度の大きな DGGE バンドを形成しておらず、複数の塩基配列が 1 本の DGGE バンドを構成している場合において、その一部として検出された (Table 1 参照)。なお、*Verrucomicrobia* 門細菌は、培養 1 回目の二槽培養系からも検出されている (塩基配列 DC1-01)。*Bacteroidetes* 門細菌のものと考えられる塩基配列と、それらと最近縁である既記載種 (*Flexibacter* 属, *Flavobacterium* 属, *Chitinophaga* 属, *Pedobacter* 属, *Emticicia* 属, *Reichenbachiella* 属, *Persicobacter* 属および *Roseivirga* 属の細菌) のタイプ株の塩基配列とは、相同性がいずれも低かった (94% 未満)。また、*Verrucomicrobia* 門細菌のものと考えられる塩基配列と、最近縁既記載種 (*Prosthecobacter* 属細菌) のタイプ株の塩基配列も、相同性が低かった (94% 未満)。*Proteobacteria* 門については、

Alphaproteobacteria 綱および *Gammaproteobacteria* 綱に属すると考えられる細菌と、最近縁である *Brevundimonas* 属, *Phenylobacterium* 属, *Sandaracinobacter* 属, *Pseudomonas* 属等の既記載種タイプ株とは、塩基配列との相同性がおおむね高かったが (多くは 98% 以上)、*Betaproteobacteria* 綱に属すると考えられる細菌と、最近縁である *Ramlibacter* 属および *Variovorax* 属の既記載種タイプ株との塩基配列の相同性は低かった (94% 未満)。

二槽培養系の培養開始から時間が経過するにつれて強度が大きくなる DGGE バンドは、主に *Bacteroidetes* 門に属すると考えられる細菌によって構成されていた。一方、培養期間が長くなるにつれて強度が小さくなるバンド、あるいは強度があまり変化しないバンドの多くが *Proteobacteria* 門 *Gammaproteobacteria* 綱に属する細菌によって構成されていた。

藻類混合無機平板培地を用いた細菌の分離と同定調製した直後の藻類混合無機平板培地は透明だったが、ゲル内に加えた *C. vulgaris* NIES-227 の増殖により、1.0% ゲランガム培地ではおよそ 1~2 日で、0.8% アガロース培地ではおよそ 3~4 日で、培地は緑色へと変化した。この平板培地の表面に二槽培養系細菌槽の培養液を接種したところ、生じたコロニーのほとんどが白色または半透明の白色だったが、一部のコロニーは培養期間の経過とともに薄い桃色や赤色を呈した。これらの細菌を分離し約 100 株を得た。分離株を、藻類混合無機平板培地に加え、1/10 NB および 1/100 NB 平板培地にも植え継いで生育を試験したところ、ほとんどの分離株は 1/10 NB および 1/100 NB 平板培地上で生育できた。しかし、接種後 10 日を過ぎてから生じた微小なコロニーに由来する分離株は、藻類混合無機平板培地では継代できたが、1/10 NB および 1/100 NB の 0.8% アガロース平板培地では生育しなかった。

分離株の 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を解読した。その塩基配列、接種源となった二槽培養系の番号 (DC2a, DC2b, および DC2c)、および分離時の平板培地の種類 (アガロースおよびゲランガム) がすべて一致する株からは、その代表を 1 株だけ選んだ。なお、同一の接種源と培地から分離された *Massilia* 属の分離株には、16S rRNA 遺伝子のほぼ全長の塩基配列は一致しないものの互いの相同性が 100% に近いものが複数含まれていた。これらについても 1 株だけ選んだ。16S rRNA 遺伝子のほぼ全長の塩基配列を SeqMatch に供し、算出された S_{ab} score に基づいて、最近縁と考えられる既記載種細菌のタイプ株を特定し (Table 2)、まずは naïve Bayesian classifier によって所属分類群を推

Table 1 Identity of DNA sequences excised from DGGE bands (Fig. 2 (DC) and Fig. 5) originated from the dialysing culture vessels.

Seq ID	DGGE band ¹	Phylum or class	Closest described genus ²	
			Genus name(s)	Similarity (%)
DC-01	DC-B	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Prostheco bacter</i>	81.9
DC-02	DC-D	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flexibacter</i>	77.8
DC-03	DC-C	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium</i>	91.0
DC-04	DC-D	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium</i>	90.3
DC-05	DC-C	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium</i>	90.3
DC-06	DC-C	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium</i>	90.3
DC-07	DC-F	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium</i>	90.3
DC-08	DC-A,B,F	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Chitinophaga</i>	86.2
DC-09	DC-F	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Chitinophaga</i>	85.6
DC-10	DC-D,F	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Phenylobacterium</i>	100
DC-11	DC-A	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Phenylobacterium</i>	97.0
DC-12	DC-A	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Phenylobacterium</i>	91.1
DC-13	DC-F	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhodospseudomonas, Nitrobacter, Afipia</i>	99.3
DC-14	DC-B,E,F	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sandaracinobacter</i>	100
DC-15	DC-D	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sandaracinobacter</i>	98.5
DC-16	DC-E	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sandaracinobacter</i>	98.5
DC-17	DC-D	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas</i>	100
DC-18	DC-A	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Caulobacter, Sphingomonas, Asticcacaulis</i>	98.5
DC-19	DC-D	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Ramlibacter</i>	93.2
DC-20	DC-B	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Variovorax</i>	92.5
DC2a-01	*DC2a-G	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Chitinophaga</i>	91.6
DC2a-02	*DC2a-G	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Chitinophaga</i>	91.0
DC2a-03	*DC2a-C, D	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Pedobacter</i>	92.9
DC2a-04	*DC2a-F	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Pedobacter</i>	92.3
DC2a-05	*DC2a-F, G	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Pedobacter</i>	98.1
DC2a-06	*DC2a-I	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Pedobacter</i>	86.5
DC2a-07	*DC2a-J	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Porphyrobacter, Sphingomonas</i>	99.3
DC2a-08	*DC2a-F	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Polaromonas</i>	95.7
DC2a-09	*DC2a-C	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	95.6
DC2a-10	*DC2a-J	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Prostheco bacter</i>	88.2
DC2a-11	DC2a-H	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flavobacterium</i>	100
DC2a-12	DC2a-H	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Brevundimonas</i>	100

Table 1 continued

Seq ID	DGGE band ¹	Phylum or class	Closest described genus ²	
			Genus name(s)	Similarity (%)
DC2a-13	DC2a-A	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Variovorax</i>	94.4
DC2a-14	DC2a-A,B	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	100
DC2a-15	DC2a-E	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	99.4
DC2a-16	DC2a-E	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	98.8
DC2b-01	*DC2b-J,K	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Enticicia</i>	91.6
DC2b-02	*DC2b-J	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Enticicia</i>	91.0
DC2b-03	*DC2b-J	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Reichenbachiella</i>	87.7
DC2b-04	*DC2b-K	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Roseivirga</i>	81.8
DC2b-05	*DC2b-L	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Roseivirga</i>	80.5
DC2b-06	*DC2b-L	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Roseivirga</i>	81.2
DC2b-07	*DC2b-H	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	100
DC2b-08	*DC2b-L	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	98.1
DC2b-09	DC2b-A,F,G	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	100
DC2b-10	DC2b-G	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	99.4
DC2b-11	DC2b-F	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	99.4
DC2b-12	DC2b-I	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	99.4
DC2b-13	DC2b-G	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	99.4
DC2b-14	DC2b-I	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	98.8
DC2b-15	DC2b-D	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	99.4
DC2b-16	DC2b-A	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	99.4
DC2b-17	DC2b-B,C	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	100
DC2b-18	DC2b-A	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	99.4
DC2b-19	DC2b-C	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	99.4
DC2b-20	DC2b-A	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	96.9
DC2b-21	DC2b-D,E	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	100
DC2b-22	DC2b-B	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	99.4
DC2c-01	*DC2c-H	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Persicobacter</i>	83.4
DC2c-02	*DC2c-H	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Persicobacter</i>	83.4
DC2c-03	*DC2c-H	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Chitinophaga</i>	87.5
DC2c-04	*DC2c-A,B	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flexibacter</i>	89.1
DC2c-05	*DC2c-E	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flexibacter</i>	88.5
DC2c-06	*DC2c-D	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Flexibacter</i>	88.5
DC2c-07	*DC2c-D,E	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Pedobacter</i>	100

Table 1 continued

Seq ID	DGGE band ¹	Phylum or class	Closest described genus ²	
			Genus name(s)	Similarity (%)
DC2c-08	*DC2c-E	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Pedobacter</i>	99.4
DC2c-09	*DC2c-C,D,E,H	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Pedobacter</i>	100
DC2c-10	*DC2c-H	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Brevundimonas</i>	100
DC2c-11	*DC2c-A	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Duganella</i>	100
DC2c-12	DC2c-F,G	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Sphingobacterium</i>	88.4
DC2c-13	DC2c-F,G	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas</i>	99.4

¹ DGGE band names correspond to those indicated in Fig. 2 (DC) and Fig. 5. A band with asterisk (*) increased its intensity in DGGE as the cultivation period increased.

² The closest described genus is that the closest type strain of described species belongs to. The closest type strain was determined by SeqMatch program. The similarity is that of the V3 region of 16S rRNA gene between the obtained sequence and the corresponding sequence of the closest type strain.

定した(後に系統解析に基づく同定も行った). 0.8% アガロースを用いた藻類混合無機平板培地にコロニーを形成し分離された細菌は、いずれも *Proteobacteria* 門の *Alphaproteobacteria* 綱, *Betaproteobacteria* 綱, または *Gammaproteobacteria* 綱に属すると考えられた. また, 1.0% ゲランガムを用いた藻類混合無機平板培地にコロニーを形成し分離された細菌の多くは *Proteobacteria* 門に属すると考えられたが, 他に *Actinobacteria* 門, *Bacteroidetes* 門, または *Verrucomicrobia* 門に属すると考えられる細菌もあった. 少なくとも今回分離された株については, 0.8% アガロースの藻類混合無機平板培地から分離されたもののほとんどが, 最近縁の既記載種タイプ株と 97% を超える高い 16S rRNA 遺伝子相同性を示し, 97% 未満のものは *Hyphomicrobium* 属細菌と考えられる DC2c-A1 株および既知の属に所属しないと考えられる *Alphaproteobacteria* 綱細菌の DC2a-A3 株の 2 つだけだった. そのうち前者は, 前述の接種後 10 日を過ぎてから生じたコロニーに由来する株である. 一方, 1.0% ゲランガムの藻類混合無機平板培地からは, 最近縁の既記載種タイプ株との 16S rRNA 遺伝子相同性が 97% 未満の細菌として, *Verrucomicrobium* 属に近縁な新属細菌と考えられる DC2a-G7 株, *Emticicia* 属細菌と考えられる DC2b-G1 株, *Prostheco bacter* 属細菌と考えられる DC2c-G4 株, および既知の属に所属しないと考えられる *Betaproteobacteria* 綱細菌の

DC2b-G2 株が得られた.

解読された 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長の塩基配列に, 参照となる細菌の配列を加え, 分類単位ごとに系統解析を行って近隣結合系統樹を作成した. 分離株の属レベルの分類について, naïve Bayesian classifier によって 80% 以上の確率で示された推定結果 (Table 2) は, 系統樹からの同定結果と一致していた (例として *Betaproteobacteria* 綱細菌および *Verrucomicrobia* 門細菌の系統樹をそれぞれ Fig. 6 および Fig. 7 を示す). *Massilia* 属, *Pseudomonas* 属, *Lysobacter* 属, *Polaromonas* 属, *Variovorax* 属に属する細菌は, 0.8% アガロースおよび 1.0% ゲランガムの両方の平板培地から分離された. そのうち *Variovorax* 属以外の 4 属については, 同一の 16S rRNA 遺伝子塩基配列をもつ株が両方の培地から得られた. 生育試験の結果, 0.8% アガロースの平板培地で生育する株は, すべて 1.0% ゲランガムの平板培地でも生育したが, 1.0% ゲランガムで生育する株の中には, *Arthrobacter* 属に属すると思われる細菌の一部や *Verrucomicrobium* 属に属すると思われる細菌など, 0.8% アガロースの平板培地では生育しないものがあつた.

プレート式二槽培養系の細菌組成 プレート式二槽培養系では, 接種源としては 2 つの二槽培養系 DC2a および DC2c の細菌槽培養液のみを用いた. 残る 1 つの

Table 2 Representative strains of each taxonomic group of bacteria isolated on the algae-containing gel plate media from the dialysing culture vessels.

Strain ¹	Genus	Phylum	Closest type strain of described species ²	
			Species and type strain	Similarity (%)
DC2a-A1	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Mesorhizobium plurifarum</i> LMG 11892 ^T	97.7
DC2a-A2	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Mesorhizobium plurifarum</i> LMG 11892 ^T	98.4
DC2a-A3	該当なし	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Roseospira navarrensis</i> SE3104 ^T	87.0
DC2a-A4	<i>Massilia</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Massilia plicata</i> 76 ^T	98.5
DC2a-A5	<i>Pseudorhodiferax</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Pseudorhodiferax soli</i> DSM 21634 ^T	98.6
DC2b-A1	<i>Rhizobium</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobium alamii</i> GBV016 ^T	99.9
DC2b-A2	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Mesorhizobium amorphae</i> ACCC 19665 ^T	99.6
DC2b-A3	<i>Pseudomonas</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> FPC951 ^T	100
DC2b-A4	<i>Lysobacter</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Lysobacter gummosus</i> KCTC 12132 ^T	98.0
DC2c-A1	<i>Hyphomicrobium</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Hyphomicrobium zavarzinii</i> ZV-622 ^T	96.4
DC2c-A2	<i>Rhizobium</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> ATCC 10004 ^T	99.6
DC2c-A3	<i>Polaromonas</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Polaromonas jejuensis</i> JS12-13 ^T	97.7
DC2a-G1	<i>Arthrobacter</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM 20119 ^T	99.1
DC2a-G2	<i>Brevundimonas</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Brevundimonas alba</i> DSM 4736 ^T	99.4
DC2a-G3	<i>Sphingomonas</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Sphingomonas soli</i> T5-04 ^T	97.4
DC2a-G4	<i>Massilia</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Massilia plicata</i> 76 ^T	98.5
DC2a-G5	<i>Polaromonas</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Polaromonas jejuensis</i> JS12-13 ^T	97.7
DC2a-G6	<i>Variovorax</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Variovorax boronicumulans</i> BAM-48 ^T	99.2
DC2a-G7	<i>Verrucomicrobium</i>	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Verrucomicrobium spinosum</i> DSM 4136 ^T	91.4
DC2a-G8	<i>Devosia</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Devosia insulae</i> DS-56 ^T	99.5
DC2b-G1	<i>Emticicia</i>	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Emticicia ginsengisoli</i> LMG 23396 ^T	99.1
DC2b-G2	該当なし	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Massilia albidiflava</i> CCUG 52214 ^T	90.5
DC2b-G3	<i>Pseudomonas</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> FPC951 ^T	100
DC2b-G4	<i>Lysobacter</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Lysobacter gummosus</i> KCTC 12132 ^T	98.0
DC2c-G1	<i>Methylobacterium</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylobacterium zatmanii</i> DSM 5688 ^T	99.4
DC2c-G2	<i>Polaromonas</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Polaromonas jejuensis</i> JS12-13 ^T	97.9
DC2c-G3	<i>Polaromonas</i>	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Polaromonas aquatica</i> CCUG 39402 ^T	98.0
DC2c-G4	<i>Prosthecobacter</i>	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Prosthecobacter vanneerventii</i> FC2 ^T	95.0

¹ DC2a, DC2b, or DC2c in a strain name indicates the dialysing culture vessel from which the strain was isolated (cf. Fig. 5), and A and G indicates 0.8 % agarose plate and 1.0 % gellan gum plate, respectively, on which the isolation was done.

² The closest type strain of described species was determined by SeqMatch program. The similarity is that of 16S rRNA gene (almost full length) between each isolate and its closest type strain.

二槽培養系 DC2b は、細菌組成の解析結果から、汎用培養法にて培養可能な既知細菌の割合が多いと予想されたためである。プレート式二槽培養系細菌槽の細菌組成を調べるため、解読された DGGE バンドの塩基配列から、その持ち主の細菌と最近縁である既記載種タイプ株を検索した。その結果、単クローンの細菌が得られた可能性があるウェル (DGGE バンドが 1 本だけ検出されたウェル) からは、いずれも *Alphaproteobacteria* 綱および *Betaproteobacteria* 綱の既知種細菌と非常に近縁な細菌のみが検出され (系統樹は割愛)、これらは汎用培地で培養可能な細菌であると考えられた。それらのウェルからは、実際に二槽培養系から分離された細菌 (上述) と共通の細菌が分離された。単クローンにならなかったウェルからは、*Bacteroidetes* 門細菌や *Actinobacteria* 門細菌も検出された。

***Ensifer* sp. CSBa 株のコバラミン合成系遺伝子**
 上述の通り、本研究で構築した混合培養系を分離源として、別の研究プログラムによりコバラミン生産細菌 *Ensifer* sp. CSBa 株が分離された。そのコバラミン合成系遺伝子が本研究により同定され、*Ensifer* sp. CSBa 株は好気的コバラミン合成に関わる 22 個の遺伝子を保有することが明らかになった。*Ensifer* sp. CSBa 株が保有する好気的コバラミン合成系遺伝子は、合成反応に関わる順番に以下の通り：*cobF*, *cobG*, *cobH*, *cobI*, *cobJ*, *cobK*, *cobL*, *cobM*, *cobS*, *cobT*, *cobU*, *cobV*, *cobD*, *cobC*, *cobB*, *cobA*, *cobE*, *cobO*, *cobN*, *cobW*, *cobP*, *cobQ*。なお、遺伝子名は、*Pseudomonas denitrificans* の該当遺伝子の名前から同定した。

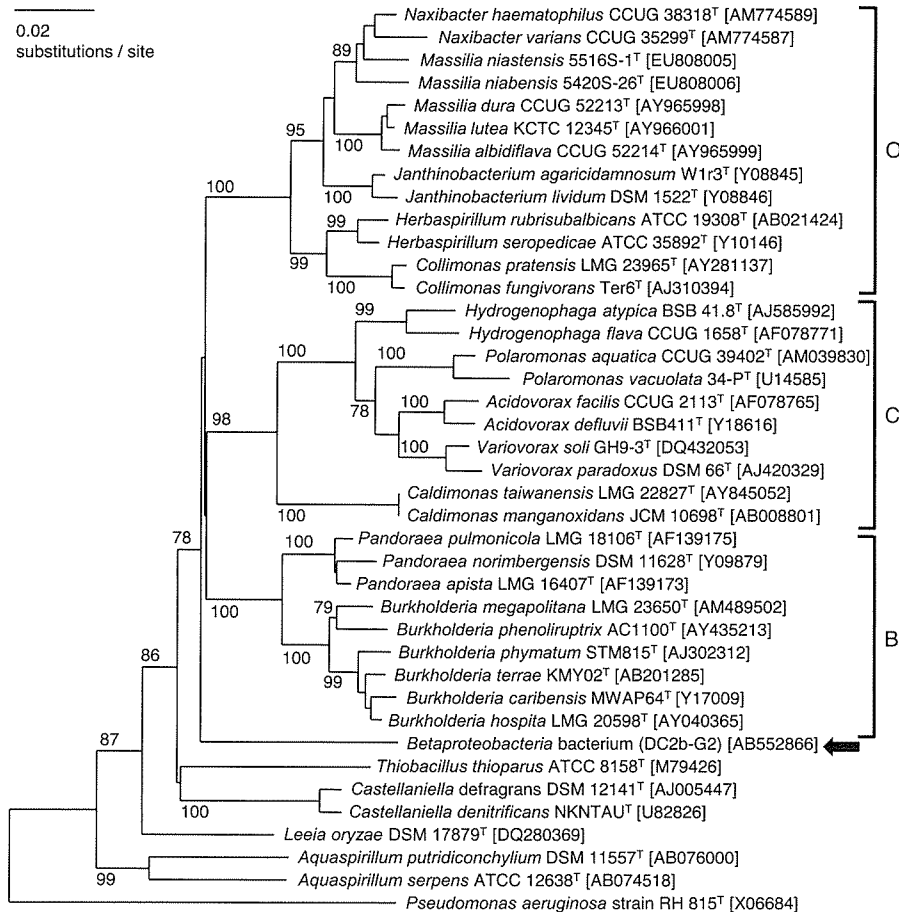


Fig. 6 Neighbour-joining tree constructed from almost full length of 16S rRNA gene sequences of *Betaproteobacteria* bacterium strain DC2b-G2 (indicated by an arrow) and the type strains of its phylogenetically related taxa. Bootstrap values greater than 70% are indicated at nodes. Accession numbers in DDBJ/EMBL/GenBank are indicated in brackets []. O, C, and B on the right hand indicate clusters of the families *Oxalobacteriaceae*, *Comamonadaceae*, and *Burkholderiaceae*, respectively, of the order *Burkholderiales*.

vulgaris の同種別株にも酵母抽出物やブドウ糖を炭素源として利用できる株が知られている (Burrell *et al.*, 1984). 本研究で用いた *C. vulgaris* NIES-227 株の従属栄養性は不明であるが、共培養系においてこの株が独立栄養に加えて細菌の生産物の一部を従属栄養的に利用していた可能性がある。

混合培養系では、共培養開始から7週間後に、*Bacteroidetes* 門および *Proteobacteria* 門に属する細菌が検出された (Fig. 3). これらのうち *Bacteroidetes* 門細菌は、藻類のいないコントロールからは検出されなかった。なお、本研究では予備実験として、NIES コレクションから取り寄せた微細緑藻の非無菌株の中の細菌組成を解析した (Ueda *et al.*, 2009; データは省略). *Bacteroidetes* 門細菌は、その予備実験でも検出されており、また土壌から分離された微細緑藻の非無菌株や海洋性のその他の微細藻類の培養液などからもしばしば検出されていることから (Sapp *et al.*, 2007; Otsuka *et al.*, 2008a), phycosphere での生育に適した特性をもつ可能性が考えられる。検出された *Bacteroidetes* 門細菌の 16S rRNA 遺伝子 V3 領域の塩基配列は、既記載細菌種のタイプ株の塩基配列と低い相同性 (<94%) を示した。本研究以前に、著者は、藻類と共存して培養される *Bacteroidetes* 門細菌は既知の種と系統的に異なるものの割合が多いことを指摘したが (Otsuka *et al.*, 2008a), 本研究でも同様の結果が得られたことになる。Blast 検索をしてみると、検出されたこれらの *Bacteroidetes* 門細菌由来の塩基配列と相同性の高い塩基配列は、環境サンプルからはしばしば検出されていることが分かった (データは省略)。よって、藻類と共存して培養される *Bacteroidetes* 門細菌は、環境中で出現する機会が限られているためにこれまで分離されなかった「難分離性細菌」ではなく、環境中の出現頻度は低くないが既存の培養法では培養されにくい培養株の存在しない (よって分類学的に記載されていない) 「難培養細菌」であると考えられる。*C. vulgaris* NIES-227 株に限らず、さまざまな藻類を利用して、このような細菌を半選択的に集積し培養できる可能性がある。なお、*Bacteroidetes* 門細菌の中には殺藻性を持つものも知られている (Toncheva-Panova & Ivanova, 2000). 本研究で検出された細菌がそのような作用を持つか不明だが、混合培養系において *C. vulgaris* NIES-227 株の生育は良好であった。

検出された *Proteobacteria* 門の細菌の中で特筆すべきものとして、*Alphaproteobacteria* 綱の *Brevundimonas* 属細菌がある。本属の細菌は、土壌から分離され無菌化されずに培養されていた緑藻の培養液からも検出されており (Otsuka *et al.*, 2008a), また、*Chlorella ellipsoidea*

への生育促進効果も報告されている (Park *et al.*, 2008). また、同じく *Alphaproteobacteria* 綱の細菌のうち、*Ensifer* 属などに極めて近縁な細菌に由来する塩基配列 MC1-17 (Fig. 3) と同一の塩基配列が、土壌由来の非無菌の緑藻培養液から検出され (Otsuka *et al.*, 2008a), また、本研究の予備実験においてカルチャーコレクションが保有する *Chlorella saccharophila* の培養液からも検出されている (Ueda *et al.*, 2009). これらの細菌も、藻類、特に緑藻の phycosphere での生育に適した特性をもち、それゆえ共存して培養されやすい可能性がある。

Proteobacteria 門細菌のうち、コントロールからも検出された *Phenylobacterium* 属、*Erythrobacter* 属および *Comamonadaceae* 科などの細菌は、*C. vulgaris* NIES-227 株混合培養系においても、藻類に頼らずに生き残った可能性が考えられる。*Erythrobacter* 属細菌には光合成をする種も知られている (Koblížek *et al.*, 2003) ことから、コントロール中の *Erythrobacter* 属細菌は光合成をしていた可能性もある。コントロール培養液における従属栄養性の細菌については、接種源としたごくわずかの土壌に由来する極めて低濃度の有機物や、接種後に少しずつ死んでいく他の細菌の遺骸などを利用した可能性がある。あるいは、7週間の培養期間中に生育はせず、生きているが培養されない (viable but nonculturable, VBNC) 状態で生残した可能性もある。しかしながら、コントロールから検出された細菌の中には、培養60週後の長期混合培養系から100% 相同な塩基配列が検出されるものもあった。そのような細菌は、コントロール培養液のような超低栄養状態でも生残できるが、藻類との共存下では藻類の生産物を利用して生育できるものと考えられる。なぜなら、長期混合培養系では、培養開始7週目に最初の植え継ぎが行われ、それ以後は3週間ごとに植え継ぎが行われたため、60週後になっても検出された細菌は、培養液の中で増殖していたと考えられるからだ。なお、コントロール培養液中で生残する細菌について、著者の研究グループによる別の研究で参考となるデータが得られた。それについては後述する。

培養開始から約60週後の長期混合培養系から検出された細菌のうち、*Alphaproteobacteria* 綱に属する多くの分類群、および *Acidovorax* 属、*Methylophilus* 属、*Cellvibrio* 属、*Pedobacter* 属に属する細菌は、培養開始から7週間後の混合培養系からも検出された。つまりこれらの細菌は、培養初期に系内で優占し、その後もある程度安定して生育・生残できる細菌であると考えられる。一方、*Bacteroidetes* 門細菌のように長期培養後に検出頻度が減ったと判断されるものや、*Brevundimonas* 属細菌のように長期の培養後には検出されなくなった

ものもある。長期混合培養系は、培養開始から7週間後に最初の植え継ぎを行った以降は、3週間に1度の植え継ぎを行ったため、増殖速度が小さいものは次第に存在割合が小さくなる。藻類と共存して培養されやすいと考えられるこれらの細菌(上述)が長期の混合培養後に減った、あるいは検出されなくなった原因は、植え継ぎ頻度にある可能性がある。しかし、著者の先行研究では、本研究と同じ植え継ぎ頻度で1年間培養された土壌由来の緑藻培養液中でも、*Bacteroidetes* 門細菌が優占していた(Otsuka *et al.*, 2008a)。藻類-細菌の混合培養系では、細菌の生存には藻類-細菌間の相互作用だけでなく、細菌-細菌間の相互作用も影響している可能性がある。なお、培養60週後の長期混合培養系から、著者の研究グループにより *Brevundimonas* 属細菌が分離されている。このような、DGGE では検出されないが分離される細菌の存在は、一つには DGGE の特性、すなわち、DGGE では群集の中で DNA 量にして概ね 1% 以上を占めるものが検出される (Muyzer *et al.*, 1993) ことによって説明される。また、本研究では DGGE バンドのうち強度の大きいものが優先的に解析された。よって、細菌群集の中でより優占しているものが、本研究で示される細菌組成に表れやすいことになる。一方、*Ralstonia* 属や *Ramlibacter* 属、*Enterobacteriaceae* 科の細菌のように、培養開始から約7週後に混合培養系から検出されなかった(一部の細菌はコントロールから検出された)が、約60週後には混合培養系から検出されるようになったものがある。これらの細菌は、培養開始から約7週後までの混合培養系では他の細菌の影響で優占できないが、長期の混合培養により細菌の群集構造が変化して優占するようになったと考えられる。

本研究の分画実験の結果、*Cellvibrio* 属および *Ralstonia* 属と同定された細菌は、藻類 *C. vulgaris* NIES-227 株の細胞が含まれる $3\mu\text{m}$ 以上の画分から強く検出された (Fig. 3 および 4)。これは、これらの細菌が *C. vulgaris* NIES-227 株の細胞に付着して生育していることを示している。*Cellvibrio* 属細菌には植物の細胞壁の多糖を分解するものがあり (Humphry *et al.*, 2003)、本実験の混合培養系においても、*C. vulgaris* NIES-227 株が分泌する粘質多糖類を *Cellvibrio* 属細菌が資化している可能性が考えられる。また、*Ralstonia* sp. と *Chlorella sorokiniana* の人工共存系においては、前者が後者の細胞に付着して生育しているという報告 (Watanabe *et al.*, 2005) も、本研究の結果と矛盾しない。海洋性藻類の非無菌培養液中において、藻類に付着して存在している細菌と付着せずに存在している細菌があり、それらは分類学的に異なることが報告されているが (Sapp *et al.*, 2007)、本研究と Watanabe *et al.*

(2005) の結果から、*Ralstonia* 属細菌は藻類細胞付着性であると考えられる。一方、*Phenylobacterium* 属、*Ramlibacter* 属の(またはそれらと近縁な)細菌は、 $3\mu\text{m}$ 以下の画分から強く検出された (Fig. 3 および 4)。よってこれらの細菌は、*C. vulgaris* NIES-227 株の細胞に付着せずに生育していると考えられる。これらはコントロールでも検出された細菌である。その他の細菌は、両画分から同程度の強度で検出される、あるいは検出強度にばらつきがあり一定の傾向が認められなかった。これらの細菌は、1種(あるいは1株)の中に、藻類細胞に付着して生育する個体と付着せずに生育する個体とが存在すると判断される。

二槽培養系の細菌組成 二槽培養系の細菌槽からは、*Proteobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門、および *Verrucomicrobia* 門に属する細菌が検出された (Fig. 3)。二槽培養系の細菌槽への *C. vulgaris* NIES-227 株の混入は見られなかったことから、これらの細菌は明らかに藻類細胞から離れて生育していることになる。

1回目の二槽培養系の細菌槽から検出された細菌 (Table 1 の前半) と、上述の混合培養系(短期)から検出された細菌 (Fig. 3) には、共通のものが多かった。これは、1回目の二槽培養系と混合培養系(短期)が、同一の接種源から同時につくられたことが原因である可能性が考えられる。しかし、たとえば *Sandaracinobacter* 属細菌またはその近縁細菌と考えられる細菌の検出の有無など差も認められる。これらの差異が、それぞれの培養系の特性に起因しているのか、偶然の要素が大きいのかは不明である。2回目の二槽培養は、同一の接種源から同時に3連で行ったが、細菌槽中の細菌組成が均質でないことを考えると、本実験の条件ではもともと細菌組成にはばらつきを生じやすい可能性がある。特に *Proteobacteria* 門 *Betaproteobacteria* 綱細菌の目あるいは科レベル以下の分類群や、*Bacteroidetes* 門の綱レベル以下の分類群にはばらつきが多かった (Table 1 後半)。本研究のようにごく微量の土壌を接種源とした時に形成される細菌群集構造には、接種源中の細菌組成がそもそも均質でないため、高い再現性は望めないものと考えられる。ただし、Otsuka *et al.* (2008a) や本研究の予備実験の結果をまとめた報告 (Ueda *et al.*, 2009) で指摘されている通り、藻類と共存して培養される細菌の門や綱レベルの分類組成の再現性は高く、その検出頻度の高さから *Proteobacteria* 門および *Bacteroidetes* 門細菌が phycosphere では優占していると考えられる。

2回目の3連の二槽培養系では、DGGE パターンによって表される細菌群集構造を経時的に追跡した。DGGE パターンは、培養期間の経過と共に変化した

(Fig. 5). なお、この期間に植え継ぎは行わなかった。DGGE バンドの消長が見られたのは、群集を構成する個々の細菌分類群の全体に占める割合が変化したため、すなわち二槽培養条件下（おそらく低栄養）で生育できないものは、死滅するか VBNC 状態になるかなどして割合が減り、増殖できるものは徐々に割合が増えるためだろう。培養期間が長くなると DGGE バンドの強度が大きくなったもの、すなわち存在比率が高まった細菌には、*Bacteroidetes* 門と同定される細菌が多かった (Table 1 後半)。上述の長期混合培養系では、培養開始60週後に *Bacteroidetes* 門の細菌が主要な細菌として検出されなかったが、Otsuka *et al.* (2008a) では本研究と同様、培養開始から1年経過した土壌由来の緑藻と細菌の混合培養系から *Bacteroidetes* 門細菌が多く検出されている。上述の通り、藻類と共存して培養される *Bacteroidetes* 門細菌には系統的に新規なものが多いことから、このような細菌を半選択的に集積するためには、藻類との二槽培養期間を長くすると効果的であると考えられる。

Watanabe *et al.* (2005) は、汎用の栄養培地を用いて *C. sorokiniana* の非無菌株から3種類の細菌を1株ずつ分離し、それらを個別に *C. sorokiniana* の無菌株（純粋培養株）に接種した。その結果、*C. sorokiniana* の細胞または細胞に接着している粘質多糖にすべての細菌株が付着して生育していたと報告した。上述の通り、藻類と共存して培養される細菌の中には、藻類に付着していない細菌が含まれることが示されたが、混合培養系の中では付着の有無にかかわらず藻類と細菌が接触する機会がある。二槽培養系の採用によって初めて、難培養と考えられる細菌が藻類と接触することなく共存状態で培養されることが示された。

藻類と共培養される2タイプの細菌群 C培地をはじめとする無機塩類溶液の中で、有機炭素源なしに長期間生存する細菌の組成が、著者の研究グループによる別の研究で解析された。その結果（未発表）の一部をここに引用すると、*rthrobacter* 属、*Microbacterium* 属、*Hyphomicrobium* 属、*Methylobacterium* 属、*Mesorhizobium* 属、*Bradyrhizobium* 属、*Caulobacter* 属、*Polaromonas* 属、*Variovorax* 属、*Pseudomonas* 属、*Lysobacter* 属などの細菌が、希釈した土壌懸濁液を溶液に接種してから12週間にわたり溶液から検出され、12週間後の溶液から実際に分離・培養された。これらの細菌は、藻類との共存培養系の中でも長期にわたって生育するものである。よって、これらの細菌が藻類の分泌する有機物の利用に有利な代謝特性を有する可能性に加え、もともと低栄養性であり飢餓耐性の強い細菌で

あるため、炭素源の濃度が低い藻類との共培養系でも生育しやすい可能性が考えられる。藻類との共培養系から検出された細菌のうち、これらの細菌を除いたもの、つまり、藻類との共存が生育の鍵となるような細菌としては、*Verrucomicrobia* 門細菌、*Acidobacteria* 門細菌、*Bacteroidetes* 門細菌の一部、*Proteobacteria* 門細菌のごく一部 (*Phyllobacterium* 属、*Ensifer* 属、*Methylophilus* 属に近縁な細菌、*Acidovorax* 属細菌など) があげられる。このように、藻類と共培養される細菌には、藻類との共存の有無にかかわらず低栄養状態で生残しやすいタイプと、藻類との共存系に選択的に出現するタイプが含まれている。

藻類混合無機平板培地を用いて分離された細菌 C培地に *C. vulgaris* NIES-227 株を生きたまま混合してゲル化した平板培地（藻類混合無機平板培地）を用い、二槽培養系細菌槽の培養液から分離された細菌のうち、16S rRNA 遺伝子のほぼ全長の塩基配列において、最も近縁な既記載種タイプ株との相同性が97%未満の株は5つあった (Table 2 の DC2a-A3, DC2c-A1, DC2a-G7, DC2b-G2, DC2c-G4)。このうち2株はゲル化剤として0.8%アガロースを用いて、残り3株は1%ゲランガムを用いて分離された。16S rRNA 遺伝子のほぼ全長の塩基配列が97%未満の相同性を示す2つの細菌はDNA-DNA ハイブリダイゼーション試験の必要なく別種として扱える (Stackebrandt & Goebel, 1994)。さらに、この境界値を98.7~99%とする提案もなされている (Stackebrandt & Ebers, 2006)。今後、生化学性状や代謝能など分類指標となる表現形質を明らかにすれば、少なくとも上述の5株は新種記載することが可能だろう。DC2b-G2 株は、*Betaproteobacteria* 綱に属するが、目または科レベルの所属分類群が不明であり、近縁な記載種が存在しない細菌である (Fig. 6)。同様に、DC2a-A3 株は目レベルの所属分類群が不明な *Alphaproteobacteria* 綱の細菌であると判定された (系統樹は省略)。

DC2c-A1 株は *Hyphomicrobium* 属細菌と同定された。前述の通り、0.8%アガロースの藻類混合無機平板培地では接種から約10日後にコロニー形成が確認され、この培地上で継代可能だったが、0.8%アガロースの1/10 NB および1/100 NB 平板培地に植え継いでも生育しなかった。一般的に *Hyphomicrobium* 属細菌は通性メチロトロフであり、メタノールやクロロメタン、メチルアミン等の C1 化合物を利用し (Kanamaru *et al.*, 1982; McDonald *et al.*, 2001)、またメタノールを基質として脱窒を行う (Sperl & Hoare, 1971)。DC2c-A1 株を Methanol-utilizing bacteria medium B (Atlas,

1997) に接種したところ、液体培地では約10日後に、0.8% アガロースの平板培地では約2ヶ月経過してから、増殖が確認できた。生きた *C. vulgaris* NIES-227 株が混合されている無機平板培地ではより増殖が早いことから、*C. vulgaris* NIES-227 株が生産する物質の方が(それが C1 化合物であろうとなかろうと) DC2c-A1 株によって利用しやすいものと考えられる。なお、この株は後の試験により、R2A 培地 (Seviour *et al.*, 1994) でも生育可能であることが判明している。

1% ゲランガムの藻類混合無機平板培地から分離された株で、最も近縁な既記載種タイプ株との 16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性が 97% 未満のものは、すべて 1% ゲランガムの 1/10 NB 平板培地でも生育できた。汎用の栄養培地でも培養できることから、難培養性細菌ではなく、難分離性細菌、すなわち環境中の出現頻度が極めて低い細菌や、増殖の早い他の細菌に生育を阻害されるために環境中から分離されにくい細菌であると考えられる。本実験では接種源として1年以上も継代してきた二槽培養系の細菌槽を用いている。二槽培養系内では従属栄養性細菌の炭素源となるものは、他に光合成微生物が出現していなければ *C. vulgaris* NIES-227 株の分泌する有機物だけであるため、それを利用できない細菌や、有機物の濃度が低すぎて十分に増殖できない細菌は、植え継ぎの繰り返しによりやがて消えてしまうだろう。それによって、通常は分離されにくい細菌の一部が集積され、分離されやすくなる効果が生じると考えられる。

Verrucomicrobia 門の *Verrucomicrobium* 属近縁細菌および *Prostheco bacter* 属細菌と同定された DC2a-G7 株および DC2c-G4 株 (Fig. 7) や、*Proteobacteria* 門 *Betaproteobacteria* 綱に属する DC2b-G2 株 (Fig. 6, 上述) は、1% ゲランガムの藻類混合無機平板培地、1/10 NB 平板培地、および無機平板培地 (*C. vulgaris* NIES-227 株を含まず炭素源も添加しない培地) で生育可能であり、コロニーの形成に伴って平板培地表面の陥没が観察された。しかし、0.8% アガロースおよび 1.5% 寒天でゲル化した 1/10 NB 培地では生育は確認されなかった。以上より、これらの細菌は、1/10 NB の成分を基質として生育しないが、多糖であるゲランガムを基質として生育できる細菌であることが分かる。藻類が分泌する炭素化合物にもまた多糖類が多いと考えられ、*Verrucomicrobia* 門細菌が無機成分からなる培地の中で長期にわたり藻類と共存して生育することが可能であることは、本門細菌が基質として多糖類を好むとされること (Hedlund, 2011) と矛盾しない。なお、これらの *Verrucomicrobia* 門分離株は、後に R2A 培地でも生育可能であることが示された。R2A 培地は様々な有機

物を含むが、多糖類としては水溶性デンプンのみを含む。R2A 培地の中のどの炭素源を利用して *Verrucomicrobia* 門分離株が生育しているのかは不明である。

Verrucomicrobia 門という分類名は、本報告文を執筆している2011年4月現在、国際原核生物命名規約のもと正式名として認められていないが、細菌分類学のバイブルとも言える *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 第2版において新たに設立された名称である。この門には記載された種がまだ少なく、特に *Verrucomicrobium* 属は、現在まだ *Verrucomicrobium spinosum* (Schlesner, 1987) の1種が記載されているのみである。*Verrucomicrobium* 属は典型的な難培養細菌の系統に含まれ、培養株はまだ2株しか知られていない。

Verrucomicrobia 門細菌に限らず、分離株はいずれも1年以上も継代培養を続けた二槽培養系の中で「集積」されていたため、この培養条件下で生育しやすい性質をもっていると考えられる。たとえば DC2c-G1 株は、*Methylobacterium* 属の既知種タイプ株との 16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性が 99% を超え (Table 2)、系統樹 (図は割愛) からも *Methylobacterium* 属細菌と同定された。一般に *Methylobacterium* 属細菌は通性メチロトロフであり、C1 化合物を炭素源およびエネルギー源とすることができる (Aken *et al.*, 2004)。本属のタイプ種である *Methylobacterium organophilum* はメタンさえも単一炭素源とすることができる (Patt *et al.*, 1976)。前述の *Hyphomicrobium* 属細菌も通性メチロトロフであり、藻類との共存培養系から分離された系統的に異なる2つの細菌が、共通の代謝能を有することは、*C. vulgaris* NIES-227 株が培養液中に分泌する物質の種類と関係がある可能性がある。この *Methylobacterium* 属細菌は、植物が生産した C1 化合物を利用する (Trotsenko *et al.*, 2001) 代わりに、植物ホルモン生産 (Ivanova *et al.*, 2001)、窒素固定 (Sy *et al.*, 2001)、病原微生物に対する拮抗作用 (Aken *et al.*, 2004) などによって植物に利益を与えることが知られている。*Chlorella* 属を含む緑藻は陸上植物の直接の祖先グループには属さないが、紅藻や灰色藻とともに植物界に属する藻類であり(他の藻類は別の界に属する)、二槽培養系内においても、それらの細菌と *C. vulgaris* NIES-227 株が何らかの相互作用を有しているのか興味を持たれる。同様の観点から、マメ科植物やアカシアなどと共生して窒素固定を行う細菌を多く含む *Rhizobiales* 目 (de Lajudie *et al.*, 1998; Ramirez-Bahena *et al.*, 2008) に属する細菌が、混合培養系や二槽培養系から多く検出・分離されることは興味深い。

16S rRNA 遺伝子のほぼ全長の塩基配列において、最も近縁な既記載種タイプ株との相同性が97%を超える株の中にも、系統樹上での近縁種との位置関係や相同性(97~98%台前半)等から、新種候補と見なせる株が複数あった。そもそも、16S rRNA 遺伝子の塩基配列相同性が100%である2株の細菌が別種となる場合もあるため、単にこの相同性が高いことが種レベルでの同一性の根拠にはならない。16S rRNA 遺伝子塩基配列以外の分類形質の検討によって、分離株の中からさらに多くの新種が見つかる可能性がある。

プレート式二槽培養系の細菌組成 寒天やアガロース、ゲランガムといったゲル培地では培養されない細菌の存在を考慮に入れ、液体培養にて細菌の単離を試みた。当初は、生菌染色した細菌を、マイクロマニピュレーターを用いて顕微鏡下で単離しようと試みたが、染色強度が不十分で細菌の識別と分離が困難であった。藻類の分泌物を生育基質とする低栄養条件下にあるため、代謝活性が低いことが原因と考えられる。そこで代替策として、マイクロウェルプレート上に小スケールの二槽培養系(プレート式二槽培養系と呼ぶ)をつくり、二槽培養系細菌槽の培養液を希釈して接種することにより、単クローン細菌と *C. vulgaris* NIES-227 株の二者：一者から成る培養系の構築を試みた。

上述の通り、細菌の単クローン化に成功したと考えられるウェルから検出されたのは、汎用培地で培養可能な既知の細菌種と近縁な細菌ばかりであった。それらの存在比率が高かったことが理由の一つとして考えられる。他にも二槽を仕切るメンブレンフィルターの差異も原因となった可能性がある。すなわち、二槽培養器のメンブレンフィルターの素材は親水性ポリエーテルスルホンであったが、プレート式二槽培養系のメンブレンフィルターの素材は無機酸化アルミニウム膜であった。素材が特定の細菌分類群に直接何らかの影響を与える可能性のほか、*C. vulgaris* NIES-227 株の分泌物の透過にも影響を与えた可能性が考えられる。

複数のバンドを生じた細菌槽からは、難培養性細菌と考えられる、培養可能な既知種の中に近縁なものがない細菌も検出された(データは割愛)。今回はこれ以上の試行はしなかったが、接種する細菌培養液の希釈が適切であれば、この方法は有効と考えられる。平板培地を用いた分離でも、試行数を増やせば新規細菌の発見の機会は増えるだろう。しかし、優占種ではあっても分離されない細菌を得るためには、平板培地による分離法には限界があると考えられる。

プレート式二槽培養系の細菌槽の中の細菌群集構造を表す DGGE パターンは、接種源である二槽培養系

DC2c の細菌槽のものと比較すると単純化されていた。接種源とした二槽培養系からは検出されなかった塩基配列も検出された。これらの塩基配列の持ち主である細菌は、二槽培養系の中では優占していなかったが、希釈接種の段階を経てはじめて、プレート型二槽培養系の細菌槽で優占するようになり、検出されたと考えられる。今後、細菌組成が単純化された細菌槽を接種源として新たに希釈接種を行えば、単クローン細菌と *C. vulgaris* NIES-227 株からなる二者：一者の培養系が、より効率的に確立できるだろう。

Ensifer sp. CSBa 株のコバラミン合成系遺伝子 *Ensifer* sp. CSBa 株は好気的コバラミン合成に関わる22個の遺伝子を保有していたが、*Ensifer* 属の他種 *Ensifer fredii* (= *Sinorhizobium fredii*) NGR 234 株や *Ensifer meliloti* (= *Sinorhizobium meliloti*) BL225C 株は嫌気的コバラミン合成系の遺伝子を有することが知られているため、今回の発見は興味深い。また、著者の知る限り、これまでに好気的コバラミン合成に関わる全遺伝子の塩基配列が解読されているのは *P. denitrificans* (1株に由来する2つの変異株)のみであり、本研究によって得られたデータは、好気的コバラミン合成に関わる全遺伝子の塩基配列としては2例目となる。

上述の *P. denitrificans* および本研究で解析された *Ensifer* sp. CSBa 株の好気的コバラミン合成系遺伝子群の配置は Fig. 8 に示す通りである。22個の遺伝子が、*P. denitrificans* では2つのクラスターに分かれてゲノム上に存在しているが、*Ensifer* sp. CSBa 株では3つのクラスターに分かれていた。しかし、遺伝子の順序は保存性が高く (Fig. 8)、また塩基配列の相同性も高かった (94~97%)。系統的に離れている *P. denitrificans* (*Gammaproteobacteria* 綱) と *Ensifer* sp. (*Alphaproteobacteria* 綱) が相同性の高い好気的コバラミン合成系遺伝子群を保有することから、これらの遺伝子群はまとめて水平伝播される可能性が示唆される。

結論 本研究により、微細藻類 *C. vulgaris* NIES-227 株と共存して培養される細菌の系統的組成が明らかになった。また、メンブレンフィルターで隔離された状態で藻類と細菌が共存培養されることが示された。少なくとも藻類と共存させた状態を保つことにより、難培養と考えられる細菌を継代できることも示された。難分離性と考えられる複数の細菌株が分離され、また、1/10 NB 培地の成分を基質として生育できない *Verrucomicrobia* 門の新種候補の細菌も分離された。こ

これらの成果により、新しい細菌資源の獲得という目的は達成され、また難培養細菌や難分離性細菌をスクリーニングするための新たな方法を提案することができた。従属栄養性の難培養細菌を得るために、藻類をパートナーとして利用するのは大変に都合が良い。なぜなら、ほとんどの藻類は独立栄養生活が可能であるため、無機培地を用いて培養できるからだ。共存パートナーとして他の従属栄養微生物を選択する場合、炭素源として有機物を含む栄養培地を用いるの必要があり、その時点で難培養細菌の集積が困難になる。難培養細菌が単クローンとして得られれば、次にはその細菌を単独で培養する方法を追求することになるだろう。藻類が分泌する物質の分析や、共存状態で細菌が発現する遺伝子の解析などにより、やがて藻類を用いずにそれらの細菌を培養する方法が確立されるものと期待する。その培養法は、他の難培養細菌の培養株の獲得や、細菌の生態を解明するヒントとなるだろう。

今後の予定 今後、二槽培養系の細菌槽からセルソーターを用いて単一の細菌細胞を得て、プレート式二槽培養系を用いて改めて *C. vulgaris* NIES-227 株との共培養系を構築することにより、難培養性細菌 1 株と *C. vulgaris* NIES-227 株との共培養系確立を目指す。そうして得られた株のゲノム情報の解析により、なぜそれらの細菌が難培養であるのかを知る手がかりが得られると期待される。また、*Ensifer* sp. CSBa 株の全ゲノムの遺伝子解析も引き続き進める予定である。

要 約

本助成研究に先立つ研究において、土壌から微細緑藻を分離して無菌化せずに培養すると、培養困難と考えられる細菌が、緑藻と共存した状態で培養されることが見いだされた。本研究では、緑藻の無菌株に土壌を接種す

ることにより、緑藻と土壌由来の細菌の共存培養系を構築し、従来の手法では培養が困難な細菌を含む様々な細菌の継代培養を行い、それらの細菌の系統分類を明らかにするとともに、新規な細菌資源を獲得することを目的とした。

まず、C 液体培地に微細緑藻 *Chlorella vulgaris* NIES-227 株と土壌懸濁希釈液を接種し、共培養系を構築した。この共培養系を数週間～1年以上にわたって継代し、培養される細菌の組成を培養非依存法によって明らかにした。また、平板培地を用いた細菌の分離・培養も行い、培養される細菌群の組成も調査した。

培養非依存法によって、共培養系から *Proteobacteria* 門および *Bacteroidetes* 門の細菌群が優占的に検出され、また *Acidobacteria* 門、*Verrucomicrobia* 門、および *Actinobacteria* 門の細菌が若干の割合で検出された。緑藻を封じ込めた平板培地を用い、これらの培養液から細菌を分離・培養したところ、*Proteobacteria* 門に属す細菌が多く分離された。*Acidobacteria* 門に属す細菌は分離されず、*Bacteroidetes* 門および *Actinobacteria* 門に属す細菌は、検出された細菌の一部のみが分離された。また、検出されていた唯一の *Verrucomicrobia* 門細菌である *Prosthecoacter* 属細菌が分離されたほか、検出されていない他の *Verrucomicrobia* 門細菌も分離された。分離株には、複数の新種や新属の候補となる細菌が含まれる。分離株のほとんどが R2A 培地で生育可能であったことから、これらの細菌は生育に藻類の共存を必要としないことが示された。一方、検出されるが分離されない細菌については、単独で培養する方法は今のところ存在しないが、緑藻との共存状態を維持することによって継代が可能であることが示された。

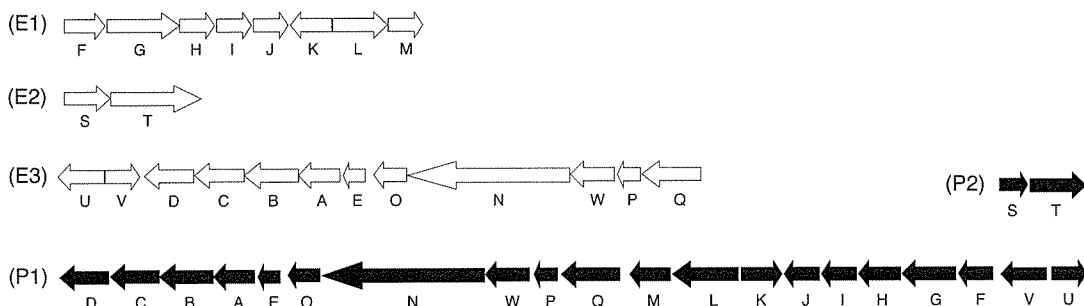


Fig. 8 The arrangements of the genes involved in cobalamin biosynthesis of *Ensifer* sp. strain CSBa (open arrows) and *Pseudomonas denitrificans* (closed arrows). The former was separated into three regions (E1 to E3) and the latter into two (P1 and P2).

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 植田紘行, 大塚重人, 妹尾啓史 (2008). 微細藻類と共存して培養される細菌の群集構造解析. 日本微生物生態学会第24回大会 (札幌).
- 2) 植田紘行, 大塚重人, 妹尾啓史 (2009). 微細藻類-細菌共存培養系からの細菌の分離. 日本微生物生態学会第25回大会 (広島).
- 3) VU, H. T., 大塚重人, 妹尾啓史 (2011). Bacteria can supply vitamin B12 for green algae. 日本農芸化学会2011年大会 (京都).

原著論文

- 1) Ueda, H., Otsuka, S. & Senoo, K. (2009). Community composition of bacteria co-cultivated with microalgae in non-axenic algal cultures. *Microbiol. Cult. Coll.* 25: 21-25.
- 2) Ueda, H., Otsuka, S. & Senoo, K. (2010). Bacterial communities constructed in artificial consortia of bacteria and *Chlorella vulgaris*. *Microbes Environ.* 25: 36-40.

保存機関に寄託した菌株 (すべて NITE-NBRC に寄託)

カルチャーコレクション株名	分類
NBRC 108606	<i>Verrucomicrobium</i> 属近縁細菌
NBRC 108607	<i>Methylobacterium</i> sp.
NBRC 108608	<i>Prostheco bacter</i> sp.
NBRC 108609	<i>Bacillus</i> sp.
NBRC 108610	<i>Microbacterium</i> sp.
NBRC 108611	<i>Arthrobacter</i> sp.
NBRC 108618	<i>Emticicia</i> sp.
NBRC 108619	<i>Pseudomonas</i> sp.
NBRC 108620	<i>Lysobacter</i> sp.
NBRC 108621	<i>Emticicia</i> sp.
NBRC 108622	<i>Caulobacter</i> sp.
NBRC 108623	<i>Polaromonas</i> sp.
NBRC 108624	<i>Brevundimonas</i> sp.
NBRC 108625	<i>Caulobacter</i> sp.
NBRC 108626	<i>Shinella</i> sp.
NBRC 108627	<i>Variovorax</i> 属近縁細菌
NBRC 108628	<i>Ensifer</i> sp.
NBRC 108629	<i>Mesorhizobium</i> sp.
NBRC 108630	<i>Alphaproteobacteria</i> 綱細菌
NBRC 108631	<i>Massilia</i> sp.
NBRC 108632	<i>Variovorax</i> sp.
NBRC 108633	<i>Rhizobium</i> sp.

NBRC 108634	<i>Mesorhizobium</i> sp.
NBRC 108635	<i>Betaproteobacteria</i> 綱細菌
NBRC 108636	<i>Hyphomicrobium</i> sp.
NBRC 108637	<i>Polaromonas</i> sp.

なお, NBRC 108606, NBRC 108608, NBRC 108623, NBRC 108625, NBRC 108626, NBRC 108627, NBRC 108630, NBRC 108635, NBRC 108636 の9株は, 現在新種記載のための解析を進めており, 記載論文発表までは非公開となっている. 今後も, 本研究で得られたほかの細菌株の寄託を進めていく予定である.

謝 辞

本研究は, 公益財団法人発酵研究所の助成により行われました. 財団ならびに関係者各位に深謝いたします.

多くの実験を行ってくださった植田紘行さん, 一部の培養株の分離を行ってくださったVU, Thi Hoanさん, 参照データを提供してくださった宮地茉莉江さん, 研究の遂行にあたって日頃より様々なご助言をいただきました妹尾啓史教授 (以上, 東京大学大学院農学生命科学研究科 (前3者は当時学生)), 一部の研究機器のご提供とデータの解釈に関するご指導をいただきました横田明博士 (東京大学分子細胞生物学研究所) に御礼申し上げます.

分離株の寄託に関しては鈴木健一朗博士および中川恭好博士 (以上, 製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部) に, また, 微細藻類培養株の利用にあたっては笠井文絵博士 (国立環境研究所生物圏環境研究領域) および恵良田真由美博士 (地球・人間環境フォーラム/国立環境研究所カルチャーコレクション) にご助言やご協力をいただきました. ありがとうございます.

文 献

- Aken, B. V., Peres, C. M., Doty, S. L., Yoon, J. M. & Schnoor, J. L. (2004). *Methylobacterium populi* sp nov., a novel aerobic, pink-pigmented, facultatively methylotrophic, methane-utilizing bacterium isolated from poplar trees (*Populus deltoides*x*nigra* DN34). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1191-1196.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Atlas, R.M. (1997). *Handbook of microbiological media*. 2nd ed. CRC Press. Boca Raton.
- Bell, W. & Mitchell, R. (1972). Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular

- products. *Biol. Bull.* **143**: 265-277.
- Bell, W. H., Lang, J. M. & Mitchell, R. (1974). Selective stimulation of marine bacteria by algal extracellular products. *Limnol. Oceanogr.* **19**: 833-839.
- Burrell, R. E., Inniss, W. E. & Mayfield, C. I. (1984). Development of an optimal heterotrophic growth medium for *Chlorella vuigaris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 281-283.
- Cole, J. J. (1982). Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **13**: 291-314.
- Cole, J. R., Chai, B., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Bandela, A. M., Cardenas, E., Garrity, G. M. & Tiedje, J. M. (2007). The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res.* **35** (Special Issue): D169-D172.
- Croft, M. T., Lawrence, A. D., Raux-Deery, E., Warren, M. J. & Smith, A. G. (2005). Algae acquire vitamin B₁₂ through a symbiotic relationship with bacteria. *Nature* **438**: 90-93.
- de Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Moreira, F., Molouba, F., Hoste, B., Torck, U., Neyra, M., Collins, M. D., Lindstrom, K., Dreyfus, B. & Gillis, M. (1998). Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 369-382.
- Hedlund, B. P. (2011). Phylum XXIII. *Verrucomicrobia* phyl. nov., *In* Krieg, N. R. *et al.* (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd Revised edition) vol. 4, p. 795-841, Springer, New York.
- Hollibaugh, J. T., Bano, N. & Ducklow, H. W. (2002). Widespread distribution in polar oceans of a 16S rRNA gene sequence with affinity to *Nitrosospira*-like ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1478-1484.
- Humphry, D. R., Black, G. W. & Cummings, S. P. (2003). Reclassification of '*Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa*' NCIMB 10462 (Ueda *et al.*, 1952) as *Cellvibrio japonicus* sp. nov. and revival of *Cellvibrio vulgaris* sp. nov., nom. rev. and *Cellvibrio fulvus* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 393-400.
- Ichimura, T. (1971). Sexual cell division and conjugation-papilla formation in sexual reproduction of *Closterium strigosum*, *In* Nishizawa, K. (ed.), *Proceedings of the 7th International Seaweed Symposium*, p. 208-214, University of Tokyo Press, Tokyo.
- Ivanova, E. G., Doronina, N. V. & Trotsenko, Y. A. (2001). Aerobic methyllobacteria are capable of synthesizing auxins. *Microbiol.* **70**: 392-397.
- Janssen, P. H., Yates, P. S., Grinton, B. E., Taylor, P. M. & Sait, M. (2002). Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2391-2396.
- Kanamaru, K., Hieda, T., Iwamuro, Y., Mikami, Y., Obi, Y. & Kisaki, T. (1982). Isolation and characterization of a *Hyphomicrobium* species and its polysaccharide formation from methanol. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 2411-2417.
- Koblížek, M., Béjà, O., Bidigare, R. R., Christensen, S., Benitez-Nelson, B., Vetriani, C., Kolber, M. K., Falkowski, P. G. & Kolber, Z. S. (2003). Isolation and characterization of *Erythrobacter* sp. strains from the upper ocean. *Arch. Microbiol.* **180**: 327-338.
- Leys, N.M.E.J., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Versraete, W., Top, E.M. & Springael, D. (2004). Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 1944-1955.
- McDonald, I. R., Doronina, N. V., Trotsenko, Y. A., McAnulla, C. & Murrell, J. C. (2001). *Hyphomicrobium chloromethanicum* sp. nov. and *Methylobacterium chloromethanicum* sp. nov., chloromethane-utilizing bacteria isolated from a polluted environment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 119-122.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. & Uitierlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
- Nedashkovskaya, O. I., Kim, S. B., Lee, D. H., Lysenko, A. M., Shevchenko, L. S., Frolova, G. M., Mikhailov, V. V., Lee, K. H. & Bae, K. S. (2005). *Roseivirga ehrenbergii* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium of the phylum '*Bacteroidetes*', isolated from the green alga *Ulva fenestrata*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 231-234.
- 太田寛行 (2003). 土壤微生物の数と種類・新しい方法, *In* 堀越孝雄, 二井一禎 (編) 土壤微生物生態学, p. 151-165, 朝倉書店, 東京.
- Otsuka, S., Abe, Y., Fukui, R., Nishiyama, M. & Senoo, K. (2008a). Presence of previously undescribed bacterial taxa in non-axenic *Chlorella* cultures. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **54**: 187-193.
- Otsuka, S., Sudiana, I M., Komori, A., Isobe, K., Deguchi, S., Nishiyama, M., Shimizu, H. & Senoo, K. (2008b). Community structure of soil bacteria in a tropical rainforest several years after fire. *Microbes Environ.* **23**: 49-56.
- Park, Y., Je, K. W., Lee, K., Jung, S. E. & Choi, T. J. (2008). Growth promotion of *Chlorella ellipsoidea* by co-inoculation with *Brevundimonas* sp. isolated from the microalga. *Hydrobiologia* **598**: 219-228.
- Patt, T. E., Cole, G. C. & Hanson, R. S. (1976). *Methylobacterium*, a new genus of facultatively methylotrophic Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**: 226-229.
- Ramirez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Peix, A., Valverde, A., Rivas, R., Igual, J. M., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. & Velázquez, E. (2008). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium leguminosarum* (Frank 1879) Frank 1889^{nl}, *Rhizobium*

- phaseoli* Dangeard 1926^{al} and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926^{al}. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (5NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58**: 2484-2490.
- Safonova, E. & Reisser, W. (2005). Growth promoting and inhibiting effects of extracellular substances of soil microalgae and cyanobacteria on *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus*. Phycol. Res. **53**: 189-193.
- Sait, M., Hugenholtz, P. & Janssen, P. H. (2002). Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. Environ. Microbiol. **4**: 654-666.
- Sapp, M., Schwaderer, A. S., Wiltshire, K. H., Hoppe, H.-G., Gerdt, G. & Wichels, A. (2007). Species-specific bacterial communities in the phycosphere of microalgae? Microbial Ecol. **53**: 683-699.
- Schlesner, H. (1987). *Verrucomicrobium spinosum* gen. nov., sp. nov.; a fimbriated prosthecate bacterium. Syst. Appl. Microbiol. **10**: 54-56.
- Seviour, E. M., Williams, C., DeGrey, B., Soddell, J. A., Seviour, K. C. & Lindrea, K. C. (1994). Studies on filamentous bacteria from Australian activated sludge plants. Water Res. **28**: 2335-2342.
- Sperl, G. T. & Hoare, D. S. (1971). Denitrification with methanol: a selective enrichment for *Hyphomicrobium* species. J. Bacteriol. **108**: 733-736.
- Stackebrandt, E. & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiol. Today **33**: 152-155.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. **44**: 846-849.
- Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C. & Dreyfus, B. (2001). Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. J. Bacteriol. **183**: 214-220.
- Takai, K., Moser, D. P., Onstott, T. C., Spoelstra, N., Pfiffner, S. M., Dohnalkova, A. & Fredrickson, J. K. (2001). *Alkaliphilus transvaalensis* gen. nov., sp. nov., an extremely alkaliphilic bacterium isolated from a deep South African gold mine. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**: 1245-1256.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. **25**: 4876-4882.
- Toncheva-Panova, T. & Ivanova, J. (2000). Influence of physiological factors on the lysis effect of *Cytophaga* on the red microalga *Rhodella reticulata*. J. Appl. Microbiol. **88**: 358-363.
- Torsvik, V., Sorheim, R. & Goksoyr, J. (1996). Total bacterial diversity in soil and sediment communities - A review. J. Ind. Microbiol. **17**: 170-178.
- Trotsenko, Y. A., Ivanova, E. G. & Doronina, N. V. (2001). Aerobic methylophilic bacteria as phytosymbionts. Microbiol. **70**: 623-632.
- Ueda, H., Otsuka, S. & Senoo, K. (2009). Community composition of bacteria co-cultivated with microalgae in non-axenic algal cultures. Microbiol. Cult. Coll. **25**: 21-25.
- Ueda, K., Yamashita, A., Ishikawa, J., Shimada, M., Watsuji, T., Morimura, K., Ikeda, H., Hattori, M. & Beppu, T. (2004). Genome sequence of *Symbiobacterium thermophilum*, an uncultivable bacterium that depends on microbial commensalisms. Nucleic Acids Res. **32**: 4937-4944.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl. Environ. Microbiol. **73**: 5261-5267.
- Watanabe, K., Takihana, N., Aoyagi, H., Hanada, S., Watanabe, Y., Ohmura, N., Saiki, H. & Tanaka, H. (2005). Symbiotic association in *Chlorella* culture. FEMS Microbiol. Ecol. **51**: 187-196.
- Xu, Y., Nogi, Y., Kato, C., Liang, Z., Ruger, H. J., De Kegel, D. & Glansdorff, N. (2003). *Moritella profunda* sp. nov. and *Moritella abyssi* sp. nov., two psychropiezophilic organisms isolated from deep Atlantic sediments. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **53**: 533-538.

腸管出血性大腸菌 O157:H7 Sakai の新規 non-coding RNA の同定と機能解析

相馬 亜希子

立教大学理学部生命理学科

〒171-8501 東京都豊島区西池袋 3-34-1

Identification and functional analysis of non-coding RNA from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 sakai

Akiko Soma

Department of Life Science, College of Science, Rikkyo (St. Paul's) University
3-34-1, Nishi-Ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 171-8501, Japan

Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 is a serious food-borne pathogen. The formation of attaching and effacing (A/E) lesions on intestinal epithelial cells requires strict control of virulence factors in EHEC through a complicated and only partially understood regulatory network. Recent studies have revealed many kinds of non-coding RNA (ncRNA) involved in various regulatory events of the cell. We identified several EHEC-specific ncRNAs and investigated their functions, especially with regard to their pathogenicity. The results showed that two novel ncRNAs (Esr29 and Esr41) are involved in the inverse gene expression between the locus of enterocyte effacement (LEE) and the flagellar regulon, which are both crucial for the formation of A/E lesions. The introduction of a multicopy plasmid carrying *esr29* into EHEC cells repressed the expression of the flagellar regulon. A multicopy plasmid encoding *esr41* had opposite effects on the LEE and the flagellar regulon in the form of an increase of the flagella protein (FliC) and a decrease in LEE proteins. We also found that Esr29 and Esr41 contain sequences complementary to LEE-encoded genes and flagellar genes, indicating the possible interactions with target mRNAs. More detailed analysis clarified that Esr41 functions, depending on an RNA chaperon Hfq, as a trans-acting antisense RNA targeting two genes. Esr41 down-regulates the translation of *ler*, the LEE-encoded transcriptional activator, by masking the Shine-Dalgarno (SD) sequence, while Esr41 simultaneously up-regulates the translation of *fliC* by opening the stem-loop structure formed around the SD sequence. The mechanism by which Esr29 represses the flagellar regulon is still unclear. The results of the present study represent the first report showing that EHEC-specific small RNAs are directly involved in the coordinated regulation of pathogenic gene expression.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7 Sakai, non-coding RNA, Hfq, post-transcriptional regulation

E-mail: soma@chiba-u.jp

共同研究者：伊豫田淳（国立感染症研究所・細菌第一部），大島拓（奈良先端大・情報科学），武藤あきら（弘前大・農学生命科学部），大西真（国立感染症研究所・細菌第一部），戸邊亨（大阪大院・医学部），林哲也（宮崎大・医学部），小椋義俊（宮崎大・医学部），関根靖彦（立教大・理学部），須藤直樹（立教大・理学部），中野雄太（立教大・理学部），喜田祐介（立教大・理学部），大戸結衣（立教大・理学部），徐真由美（立教大・理学部），栗原奈那子（立教大・理学部）

緒 言

腸管出血性大腸菌（enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC）はヒトを宿主とする下痢原性大腸菌の一種であり、O157:H7 Sakai は1996年に大阪府堺市で起きた集団感染時に患者から単離された株である。EHEC O157 の感染は、約 100 匹程度の菌数で成立することが知られ、感染すると出血性大腸炎を引き起こし、赤痢菌に由来する志賀毒素（Stx1, Stx2）により、重篤な場合は溶血性尿毒症や脳症といった生死に

関わる疾患を合併する (飯田, 2001). EHEC O157 の腸管上皮細胞への接着には, おもに LEE (locus of enterocyte effacement) 遺伝子群によってコードされた III 型分泌装置と, そこから分泌される分泌タンパク質が重要なはたらきをする (伊豫田, 渡邊, 2004; 立野, 2007; Schmidt, 2010). LEE 遺伝子群は 5 つのオペロンからなり, その制御は LEE1 オペロンの先頭にコードされている転写因子 Ler によって正に制御されている. Ler はその上流転写因子 PchABC (なかでも PchA の重要度が高い) によって正に制御されている. 当然ながら病原因子は宿主細胞の免疫系の標的になりやすく, したがって, 病原細菌はそれを回避するために, 必要な状況においてのみ病原性遺伝子を発現させることが効率的な病原性発現に必要であると考えられる. また, 病原性発現の際には転写因子 GrlRA システムを介して, べん毛遺伝子群 (べん毛レギュロン) の発現が抑制される. これも宿主細胞への接着の際に, べん毛が宿主側の免疫系による標的となるのを回避するためであると考えられている. 実際には, べん毛レギュロンを強制的に発現させた O157 株は宿主細胞への接着性が減少すること, また, LEE が活性化されるときにべん毛が存在すると初期接着が阻害されることが報告されている (Kaper *et al.*, 2004; Iyoda *et al.*, 2006; Mellies *et al.*, 2007). したがって, Fig. 1 に示した LEE 遺伝子群とべん毛レギュロンの逆相関的な発現制御は, EHEC O157 の病原性発現において重要である.

2001年に *E. coli* O157:H7 の全ゲノム配列が決定されたのをきっかけに, EHEC の病原性の実体の解明はさらに進んだ (Hayashi *et al.*, 2001; Perna *et al.*, 2001). 多くの病原性細菌と同様に EHEC においても, 遺伝子の水平伝搬による基本的な病原性遺伝子群の確立と, 既存の遺伝子発現システムとの協調性獲得の試行錯誤と共進化の結果として現在のような複雑かつ精巧な病原性発現制御機構が成立したと考えられており, その制御機構には未だに不明な点も残されている (Ohnishi *et al.*, 2001; 林, 2003; 戸邊, 2008; Ogura *et al.*, 2009).

近年, タンパク質をコードせず, それ自身が機能性分子としてはたらく non-coding RNA (ncRNA; 非翻訳型 RNA) が注目されており, 原核生物および真核生物の様々な生物種においてその生物学的意義は明白である. 特に真核生物における RNAi の発見 (Fire *et al.*, 1998; Hamilton & Baulcombe, 1999; Elbashir *et al.*, 2001) 以降, そして, 昨今のトランスクリプトーム解析の進展とともに, 遺伝子発現制御の一端を担う機能性 RNA 分子の研究が盛んに行われている. バクテリアにおいても多くの低分子 ncRNA が同定され, 大腸菌では約 90 種の ncRNA の存在が報告されている (Waters & Storz, 2009; Raghavan *et al.*, 2011). 病原性細菌の病原性遺伝子の発現に関わるものも発見されているが (Toledo-Arana *et al.*, 2007), EHEC O157 に特異的な ncRNA は未だ見当たらず, 病原性の発現制

A Esc29 (1256215 or 1256187-1255892)

```
AGCGGTCAGGTTGTTTCTACAACCACTAAACCCGCAATATCCAATGATCCCATGCAATGAGAGTTG
TTCCGTTGTGGGAAAGTTATCGCCGGCCAATGGCCTGAAGAGACGTTTTGGGTAAGAGGATA
GATGGAGTTTAAATGGCCATGAGTATCAAGCGGTCAAAAAGAAGTTCATCTATTCATTGAAAGCATA
AGGCCATCTGAGTATATCCGTAATGATCTGGATATTGTCTATAACATCAATGACCGGACGATAGATA
TCGGTGAGCAGCGTCTGTATGGCAGGGTGAGGCAGGTGAAAAACGTCTGCCATCAACAAG
AATCAAGTGATCCGCTCTCTGGACAGATGGAAAATTTATTGGATGCAAAAAGATATGAAATAACA
CCTGTATAGCACGGAGCTTTCTCTGACCGATGCACTTGAAGTTGTTAGGGCTGACCCAGCCTGC
TGTTCCTTTAAGTAAGAGAAAAGAGATTTAGGAGATGAAAGGTCGCAGAGGTGCGGCCCTTTTTTA
TTGAGAGTGGATCCTTGAACGGAAATTCCTCAAGACTTGAGTCTTGCATGCAAATCAATTCCTGGAT
AAACTCGATCTGAGTCAATAACTTAGAGAGAGAGCA
```

B Esc41 (1422271-1422203)

```
GCGCTATTCTTGCTGGCGTAGGCATCGCCATACTATGAATATTGTGTTGTCGTTGATTCAATTTTTA
TTTATAACCTCTACCCGGAGCAAATTCAGGTAGGTCATGCATAAAAATATCTTTCTATACTACGAAA
ATTATTTTTGTGAAAGTATTGACAACGCTAATTTTTAATTATATATTCATGATGCTCTAGGCATCA
CATTTCCTCCTATGGGATATCCCTCCGCGGCACTATGTGTTGCTGGCGTTTTTTTATCAATTCCT
ACTTTTTAATCCCACTGTCCCTTCCACCAGA
```

Fig. 1 Nucleotide sequence of EHEC O157:H7 Sakai non-coding RNAs: (A) Esc29 and (B) Esc41. Positions for predicted start and stop site of each gene in the EHEC genome is denoted according to the web site for *E. coli* O157:H7 Sakai genome project, <http://genome.bio.titech.ac.jp/bacteria/o157/index.html>. Nucleotide sequences for the possible promoter sequence (-35 and -10-sequence; two sets for Esc29 and Esc41) and terminator sequence (one set for each) are underlined. Predicted 5'-end of ncRNA molecules are indicated in bold. The sequences complementary to the target mRNA candidates are boxed, solid line for *flhD* in panel A; solid line for *ler* and dashed line for *fliC* in panel B.

御機構におけるブラックボックスを解明する鍵が ncRNA である可能性は高い。この可能性を検討するため、また、様々な生命現象に関わる RNA 分子のあたらしい作用機作の探索を目指して、著者らは *E. coli* O157:H7 Sakai の株特異的配列の遺伝子間領域から ncRNA の探索を行い、その結果、数種類の ncRNA を見出した。本研究における分子生物学的な解析から、そのうち 2 つの ncRNA が、宿主細胞への接着過程にはたらく遺伝子群の発現制御に関わっており、その作用機作は mRNA を標的としたアンチセンス機構にもとづいていることを明らかにした。また、この制御機構には RNA シャペロンである Hfq タンパク質 (Valentin-Hansen *et al.*, 2004; Aiba, 2007) が必要であることが分かった。

実験方法

ncRNA 遺伝子の同定および発現の解析 O157:H7 Sakai の染色体ゲノム (*Escherichia coli* O157:H7 Sakai genome project, <http://genome.bio.titech.ac.jp/bacteria/o157/index.html>) から 400 bp 以上の長さをもつ遺伝子間領域を抽出し、そのなかから、プロモーター配列およびターミネーター配列を含み、安定な 2 次構造を形成しうる配列を目視により検索した。同定された ncRNA 候補に対して 8~10% 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動、および 5' 末端をラベルしたオリゴ DNA プローブを用いたノザン解析を行った。解析に用いた粗画分 RNA は、LB 培地または DMEM 培地 (Dulbecco's modified Eagle, GIBCO; 0.5% グルコースを添加) で培養した O157:H7 Sakai の細胞から ISOGEN (ニッポンジーン) により抽出した。DMEM 培地での培養は、EHEC の LEE 遺伝子群の発現誘導を促進することが報告されている (Abe *et al.*, 2002)。各生育ステージの ncRNA の細胞内蓄積量の解析には、リアルタイム PCR 法 (SYBR Green Realtime PCR Master Mix, TOYOBO; ABI PRISM 7700) を用いた。各実験はすべて製品添付マニュアルに従った。

ncRNA 遺伝子の欠損株と過剰発現株の構築 Wanner の L ラムダレッド法 (Datsenko & Wanner, 2000) を用いて、Sakai 株の各 ncRNA 遺伝子の欠損株を作製した。また、Esr29 または Esr41 のプロモーターからターミネーターまでを含む領域を pGEM-Teasy (pUC ori, 200~700 コピー/細胞, promega) または pRS414 (ColE1 ori, 200~700 コピー/細胞, Simons *et al.*, 1987) にクローニングしたものを Sakai 株に導入し、それぞれ高コピー数プラスミドおよび中程度のコピー

数プラスミドによる ncRNA の過剰発現株とした。ノザン解析により、これらの細胞における各 ncRNA の過剰発現を確認した。

ウェスタンブロット解析 Sakai 株を LB 培地または DMEM 培地 (0.5% グルコースを添加) を用いて 37°C で培養した細胞を破碎し、8~10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、各種抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。実験は文献 (Iyoda & Watanabe, 2005; Iyoda *et al.*, 2006) を参考に行った。

大腸菌の遊走性および細胞接着能の解析 各大腸菌株のコロニーを、DMEM 軟寒天培地 (0.5% グルコース, 0.25% agar) で 25°C, 5~6 時間程度培養し、その遊走円の大きさを観察した。細胞接着能の解析は以下の通りである。10% FBS を含む DMEM 培地で培養した HEp-2 培養液中に EHEC を植菌し、37°C で 1 時間インキュベートした後にギムザ染色し、顕微鏡で観察した。いずれも文献 (Iyoda & Watanabe, 2005; Iyoda *et al.*, 2006) を参考に行った。

マイクロアレイ解析とリアルタイム PCR 解析 リアルタイム PCR 法は SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TOYOBO; ABI PRISM 7700) を用いて行った。マイクロアレイ解析は GeneChip *E. coli* genome 2.0 (Affimetrix) を用いて行った。解析に用いた RNA サンプルは、DMEM 培地で培養した Sakai 株から RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて調製した。実験方法はすべて製品添付マニュアルに従った。

lacZ assay による翻訳活性測定 翻訳活性測定に用いた標的遺伝子のプラスミドは、以下の方法で構築した。標的遺伝子候補 (*pchA*, *ler*, *flhD*, *fliC*) の、プロモーターを含まない 5' 側非翻訳領域 (5'-UTR) および各 ORF の N 末側の 10~14 アミノ酸コード領域の下流にインフレームで β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) を融合したものを、アラビノース誘導プロモーターをもつ pBAD30 (Guzman *et al.*, 1995) につなげた。また、Esr29 または Esr41 のプロモーターからターミネーターまでを含む領域を pJAC4 (Jaurin, 1987) にクローニングした。これらのプラスミドを SKI-5141 (Sakai/ Δ (*lacZYA*))::kan; 伊豫田, 渡邊, 2004), MC1061 (*hsdR*, *mcrB*, *araD139*, Δ (*araABC-leu*)7679, Δ *lacX74*, *galU*, *galK*, *rpsL*, *thi*)、および MC1061 (*hsdR*, *mcrB*, *araD139*, Δ (*araABC-leu*)7679, Δ *lacX74*, *galU*, *galK*, *rpsL*, *thi*, Δ *hfq*::*cat*) に導入した。以上の株を、適当な抗生物質および 0.02~

0.2%のアラビノースを含むLB培地で形質転換体を培養し、Millerの方法にしたがって β -ガラクトシダーゼ活性の測定を行った。

ncRNA と Hfq の相互作用の解析 Sakai株由来の *hfq* (Ecs5148) を pET-22b(+) (Invitrogen) にクローニングしたものを BL21 (DE3) に導入し、組み換え体 Hfq タンパク質を得た。タンパク質の濃度測定は SDS-PAGE において BSA 標準溶液と比較することで行った。ncRNA は *in vitro* 転写物を用いた (Sampson & Uhlenbeck, 1988)。5' 末端を 32 P で標識した ncRNA *in vitro* 転写物, 50 mM HEPES (pH 7.5), 250 mM NH_4Cl , 10 mM MgCl_2 を混合したのち, 90°C で 2 分, 37°C で 5 分インキュベートし, さらに 0.12~1.2 uM Hfq 溶液を加えて 37°C で 30 分インキュベートした反応溶液を用いて 8% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。競合反応の Competitor として, 標識していない 10~250 nM ncRNA *in vitro* 転写物を用いた。

結 果

新規 non-coding RNA の同定 *E. coli* O157:H7 Sakai 株 (染色体ゲノム約 5.5 Mbp と 2 つのプラスミド約 0.1 Mbp) と K-12 株 (約 4.6 Mbp) を比較すると, 4.1 Mbp にわたる領域が非常によく保存されており, この領域内での遺伝子の配置はほぼ同じである (Hayashi *et al.*, 2001)。この高度に保存されたゲノムの基本骨格に, 各菌株に特異的な様々な大きさの DNA 断片がさまざまな箇所に多数挿入されており, Sakai 株に特異的な配列は S ループ, K-12 株に特異的な配列は K ループと呼ばれている。S ループの全長は 1.4 Mbp であり, その上には志賀毒素や細胞接着因子など多数の病原性関連遺伝子がコードされている。著者らは, Sakai 株のゲノム上のタンパク質遺伝子の間の配列すなわち遺伝子間領域から 400 bp 以上の長さのものだけを抽出し, その中からプロモーター様配列およびターミネーター様配列を含み, さらに ncRNA として安定に存在するための 2 次構造を形成するような配列を目視により探索し, ncRNA 遺伝子候補とした。その結果, 約 1000 か所の遺伝子間領域から 28 個の候補が抽出された, これらの候補に対して Sakai 株の粗画分 RNA を用いたノザン解析を行ったところ, 6 個の候補でシグナルが検出され, Sakai 株細胞内での発現が確認された。このうち, 4 つの遺伝子はそれぞれ 2 種の ncRNA をコードしていることが分かった。残り 2 つは, Sakai 株のゲノム上に 1 コピーずつ存在し, 同じ EHEC である EDL933 株にもホモログ遺伝子が

存在することが遺伝子検索により明らかになった。著者らは後者の 2 つの ncRNA を, Esr29 (*E. coli* small RNA 29) および Esr41 (*E. coli* small RNA 41) と命名した (Fig. 1)。本稿ではこの 2 つの新規 ncRNA の機能解析の結果を示す。Esr29 と Esr41 はいずれの遺伝子もその上流と下流にプロモーター配列とターミネーター配列を持つことから, 単一の転写単位であると予想される (Fig. 1)。ノザン解析の結果から, Esr29 と Esr41 はそれぞれ約 300 nt および約 70 nt の長さを持つことが分かった (Fig. 2)。Esr41 をクローニングしたプラスミドを Sakai 株または K-12 株に導入し, オリジナルではないプロモーターから発現させても, いずれの場合も 70 nt ほどのサイズの RNA が検出されることから (データ非掲載), Esr41 は転写後に, 両株に共通に存在するリボスクレアーゼによってプロセッシングを受けると考えられる。発現時期をしらべるため, 各生育ステージにおける RNA の細胞内蓄積量をリアルタイム PCR 法で解析した結果, Esr29 は exponential stage で蓄積量が多くなり, stationary phase になると急速に減少した (データ非掲載)。Esr41 はいずれの時期においても一定の蓄積量を示した (データ非掲載)。

Esr29 および Esr41 の欠損株または過剰発現株の解析 Esr29 および Esr41 の機能解析を目的として, Esr29 および Esr41 の欠損株および過剰発現株を作製し, ウェスタンブロットングおよびマイクロアレイによる LEE 遺伝子群やべん毛遺伝子群の発現量の解析, および遊走性やヒト培養細胞への接着効率の解析

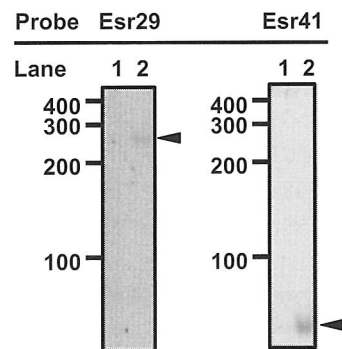


Fig. 2 Northern blot analysis for Esr29 (left) and Esr41 (right). The positions of band detected are indicated by arrowheads. The positions of RNA molecular weight markers (Dynamarker RNA Low, BioDynamics Laboratory) are also indicated. Total RNA purified from K-12 (lane 1) and Sakai (lane 2) was separated on a 10% polyacrylamide gel containing 8 M urea.

を行った。Esr29 と Esr41 のそれぞれの欠損株を作製し、LB または DMEM 培地における生育、溶血活性、細胞接着効率を解析した結果、野生株との明らかな違いは見られなかった（データ非掲載）。また、遊走性にも大きな影響は見られなかった（Fig. 3A）。以上の結果から、Esr29 と Esr41 は上述の培養条件における Sakai 株の生育および細胞接着には非必須であると予想される。

高コピープラスミド（pGEM-Teasy; pUC ori, 200~700 コピー/細胞）により Esr29 を過剰発現させた Sakai 株の細胞破碎溶液に対してウェスタンブロット解析を行った結果、べん毛繊維タンパク質（フラジェリン）である FliC の細胞内量が著しく低下した（Fig. 4A, lane 2）。しかし、中程度のコピー数のプラスミド（pRS414; ColEI ori, 25 コピー/細胞）を用いた場合に

はそのような現象は見られなかった（Fig. 4B lane 3, 4）。いずれの場合も軟寒天培地上での遊走性に大きな影響は見られなかったが（Fig. 3A）、これはそもそも野生株の遊走円が小さいため、それ以上の遊走性の抑制を検出することが困難であることが原因となっている。プラスミドのコピー数に関わらず、Esr29 を過剰発現させても、LEE にコードされる病原性因子 EspB のタンパク質量には変化が見られず（Fig. 4A, lane 2, Fig. 4B, lane 3, 4）、ヒト培養細胞への接着効率にも野生株との違いは見られなかった（Fig. 3B）。以上の結果は、少なくとも高コピー数のプラスミドから過剰に発現させた場合に、Esr29 にはべん毛レギュロンの発現を抑制する効果があることを示唆している。直接の標的遺伝子を同定するため、Esr29-pRS414 を導入した Sakai 株の細胞から抽出した RNA を用いてアレイ解析およ

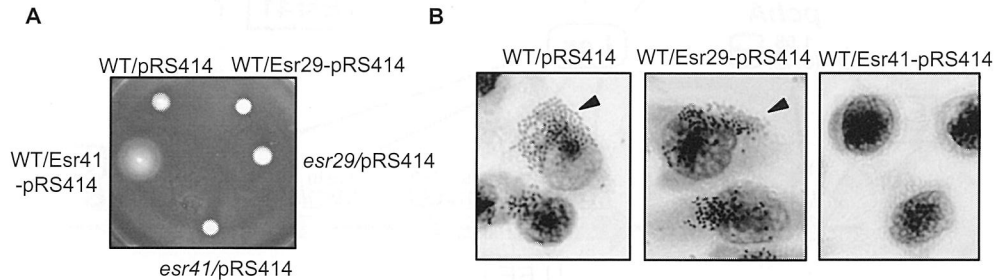


Fig. 3 Effects of multicopy and deletion of *esr29* or *esr41* gene on motility and adhesion of EHEC O157:H7 Sakai to Hep-2 cells. (A) Motility phenotypes of EHEC strains were analyzed on a DMEM plate medium containing 0.25% agar. The following strains were used: EHEC wild type, and *esr29* or *esr41* deletion mutant complemented with *esr29* or *esr41* encoded on pRS414. (B) Adhesion ability of EHEC wild type harboring pRS414, Esr29-pRS414 or Esr41-pRS414 is shown. Microcolonies are indicated by arrowheads.

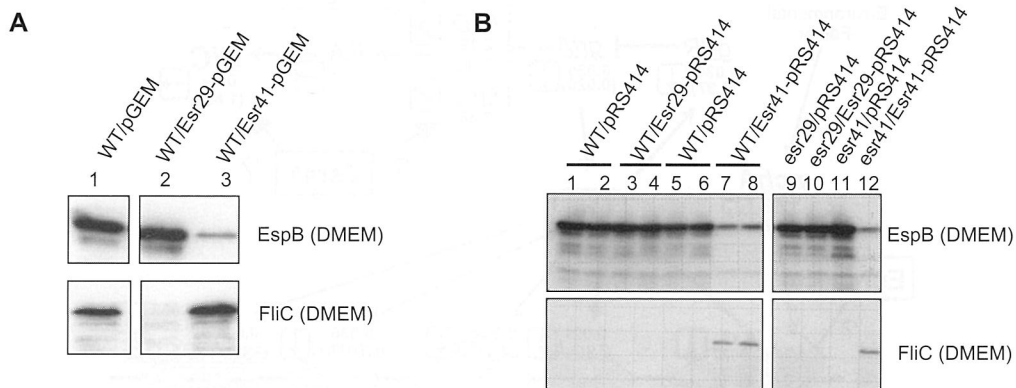


Fig. 4 Effects of multicopy and deletion of *esr29* or *esr41* gene on the expression of flagella and LEE of EHEC O157:H7 Sakai was measured by Western blot analysis. The following strains were used: EHEC wild type, and *esr29* or *esr41* mutant complemented with *esr29* or *esr41*. Esr29 or Esr41 is encoded on (A) a high-number-copy plasmid, pGEM or on (B) a medium-number-copy plasmid, pRS414. All strains in panel A and strains for detecting EspB in panel B were grown in LB at 37°C. Strains for detecting FliC in panel B were grown in DMEM at 37°C.

びリアルタイム解析による遺伝子発現の網羅的解析を行ったところ、ウェスタンブロット解析では表現型が検出されなかったにも関わらず、pRS414によるEsr29の過剰発現株ではべん毛遺伝子群のmRNA量に著しい低下が見られた (Fig. 5A). べん毛レギュロンの発現を総括的に制御する転写因子 *flhDC* よりも下流の遺伝子の mRNA 量が著しく低下していることから、Esr29は *flhDC* を標的にしており、その翻訳活性を抑制すると予想される。

Esr41 過剰発現株では、プラスミドのコピー数に関わらず、べん毛繊維タンパク質である FliC タンパク質の細胞内蓄積量が増加し (Fig. 4A, lane 3, Fig. 4B, lane 7, 8), それに伴って遊走性も著しく上昇し、野生株に比べて大きな遊走円を形成した (Fig. 3A). べん毛レギュロンの最上流転写因子 *flhD* の mRNA 量が微増しているものの (Fig. 5B), その下流の遺伝子群の mRNA にはほとんど変動がみられず、Esr41が *flhD* を標的にしている可能性は低い。一方、*fliC* の mRNA

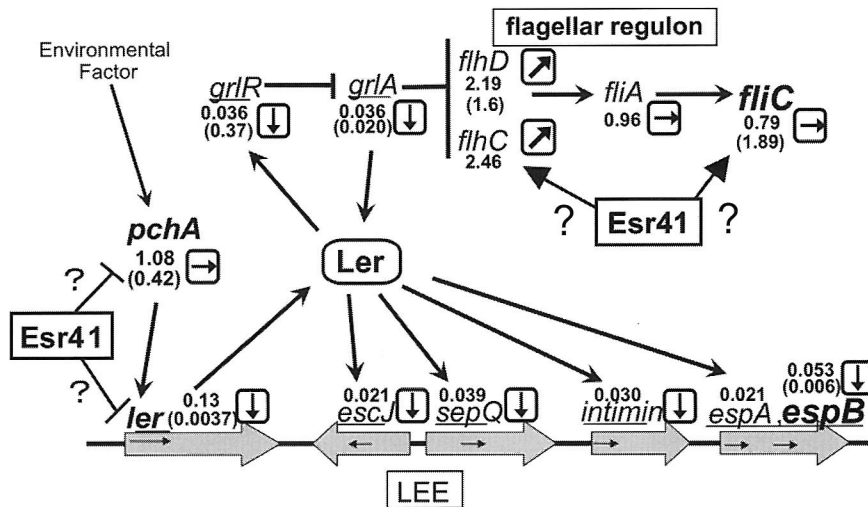


Fig. 5 Effects of multicopy plasmid carrying *esr29* gene on the expression of flagella regulon and LEE of EHEC O157:H7 Sakai. The expression level of total genes of Sakai/Esr29-pRS414 relative to that in wild type was analyzed by microarray analysis, and fold changes for flagella and LEE are indicated. Total RNA was purified from cells cultured in DMEM at 37°C to OD₆₀₀~0.4.

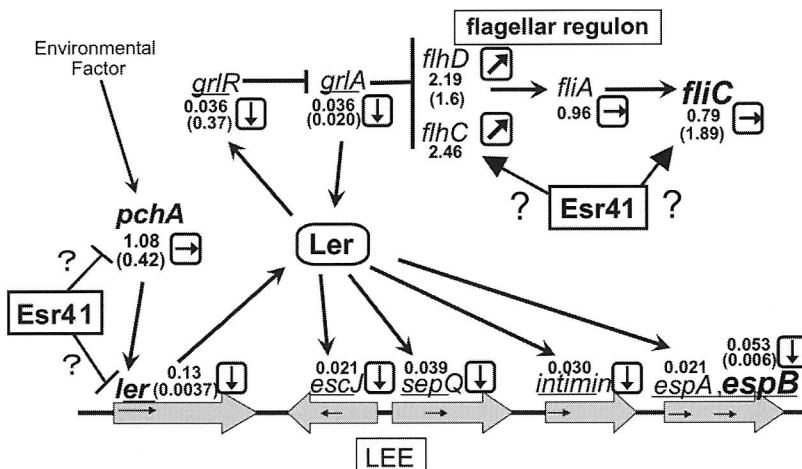


Fig. 6 Effects of multicopy plasmid carrying *esr41* gene on the expression of flagella regulon and LEE in EHEC O157:H7 Sakai. The expression level of total genes of Sakai/Esr41-pRS414 relative to that in wild type was analyzed by microarray analysis, and fold changes are indicated. Total RNA was purified from cells cultured in DMEM at 37°C to OD₆₀₀~0.6.

量にも微増が観察されるため (Fig. 5), Esr41 は直接 *fliC* の翻訳活性を促進し, その結果として *fliC* の mRNA が安定化している可能性が考えられる. Esr41 の過剰発現は LEE 遺伝子群の発現にも影響をおよぼし, ヒト培養細胞への細胞接着能がほとんど消失した (Fig. 3B). LEE を統括的に制御する転写因子 *pchA* の mRNA 量には大きな変動がみられないのに対し, *pchA* により転写促進を受ける転写因子 *ler* の mRNA 量が低下していることから (Fig. 6), Esr41 により *pchA* の翻訳が抑制されているか, あるいは *ler* の翻訳が抑制された結果として, *ler* の mRNA が不安定化したと予想される. 緒言でふれたように, O157:H7 のべん毛はヒト細胞への接着には抑制的な効果を示すと考えられる. Esr41 の過剰発現はべん毛と LEE 両方の発現に影響を及ぼすことから, Fig. 3B で観察された Esr41 の接着抑制効果は, LEE の発現抑制による接着とそれに伴う A/E 傷害の直接的な阻害だけでなく, べん毛発現促進による接着阻害にも起因すると考えられる.

標的遺伝子の同定と, ncRNA のアンチセンス機構の可能性の検討 上述のように, 主にアレイ解析とリアルタイム PCR による解析から, Esr29 と Esr41 の

標的候補遺伝子候補がいくつか絞られた. バクテリアの既知の ncRNA の多くはアンチセンス RNA として機能し, 標的遺伝子の mRNA に相補的に結合することで, その翻訳活性を促進または抑制する (Aiba, 2007; Waters & Storz, 2009). その際, アンチセンス RNA は, 標的遺伝子の mRNA の, 主に翻訳開始コドン付近の配列に対して数十塩基の相補性を示すことが分かっている. Esr29 と Esr41 のアンチセンス RNA としての機能の可能性を検討するため, 既存の標的遺伝子検索ソフトウェア TargetRNA (Tjaden, *et al.*, 2006; 2008; <http://snowwhite.wellesley.edu/targetRNA/>) を用いて解析を行ったが, 該当遺伝子は検出されず, 我々の解析により得られた標的候補遺伝子 (*flhD*, *fliC*, *pchA*, *ler*) のいずれにも, 既知の ncRNA と標的 mRNA との間にみられるような十分な長さの相補配列は検出されなかった. そこで我々は, Esr29 または Esr41 とその候補遺伝子の配列との相補性の検索を目視により行った. その結果, Esr29 または Esr41 と上述の候補遺伝子の開始コドン付近に, 既知のアンチセンス RNA と標的 mRNA の間にみられるような塩基対よりも短い, 相補的な配列を発見した (Fig. 1).

この配列の相補性にもとづいた翻訳制御の可能性を

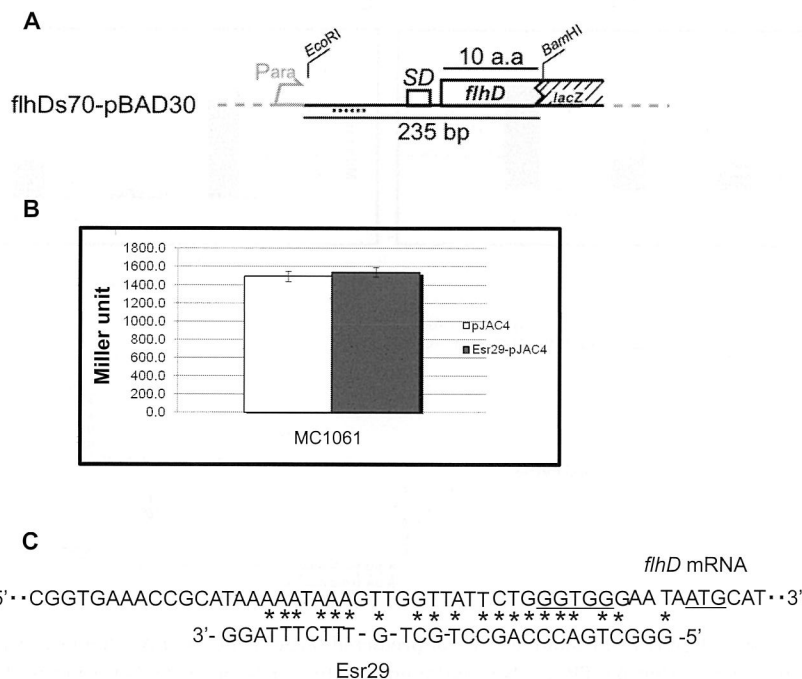


Fig. 7 Effects of Esr29 on translational activity of predicted target genes. (A) A schematic representation of flhDs70-pBAD30 in that 5'UTR, a ribosomal binding site and 10 bp of *flhD* are spaced in front of *lacZ*. Dashed line indicates the sequence to which Esr29 is predicted to bind. (B) Translation of *lacZ* from flhDs70-pBAD30 was assessed with or without Esr41 in K-12 strain MC1061. (C) Possible base pairings between *flhD* mRNA and Esr41. In the sequence of *flhD* mRNA Shine-Dalgarno sequence is boxed and start codon is underlined.

検討し、直接の標的遺伝子を同定するため、標的候補遺伝子 (*pchA*, *ler*, *flhD*, *fliC*) の 5' 側非翻訳領域 (5'-UTR) および各 ORF の N 末側の 10~14 アミノ酸をコードする領域の下流に、インフレームで β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) を融合したプラスミドを用いたレポーターアッセイを行い、プラスミドから過剰発現させた Esr29 および Esr41 が各候補遺伝子の翻訳活性に与える影響を調べた (Fig. 7, Fig. 8). しかし、上述の候補遺伝子は、いずれもストレス・環境応答に関与する内在性および外来性の調節因子による発現制御を受けるほか (戸邊, 2007), 自身による自己調節機構をもつため, Sakai 株細胞内での正確な活性測定が困難であると予想した. そこで, 標的候補遺伝子の転写をアラビノースプロモーターによって制御し, さらに Sakai 株特異的な転写因子を持たない K-12 株を用いてアッセイを行うことで, 上述のようなノイズを排除し, 標的候補遺伝子の翻訳活性に対する Esr29 または Esr41 の影響だけを解析できると期待し実験を行った.

その結果, *flhDs70*-pBAD および Esr29-pJAC4 を保持する K-12 株と, *flhDs70*-pBAD および pJAC4 を保持する K-12 株とで, β -ガラクトシダーゼ活性に顕著な差はみられなかった (Fig. 7A). すなわち, Esr29 を過剰発現させても, Esr29 の標的候補である *flhDs70-lacZ* の翻訳活性は変動しなかった. 以上の結果は, 少なくともこの実験系においては, Esr29 の過剰発現は *flhD* の翻訳活性に影響を与えないことを示唆しており, *flhD* 以外に標的遺伝子が存在しているか, あるいはアンチセンスとは別の機構で発現の制御を行っている可能性があり, 他の手法による解析が必要である.

マイクロアレイ解析, リアルタイム PCR 解析と相補的配列予測の結果から, Esr41 は LEE の主要な転写因子である *pchA* または *ler* を標的としてその翻訳を抑制すると予想された (Fig. 6). レポーターアッセイの結果, Esr41 の K-12 株および Sakai 株での過剰発現はいずれも *pchA* の翻訳にはほとんど影響を与えなかった (データ非掲載). 一方, Esr41-pJAC4 存在下

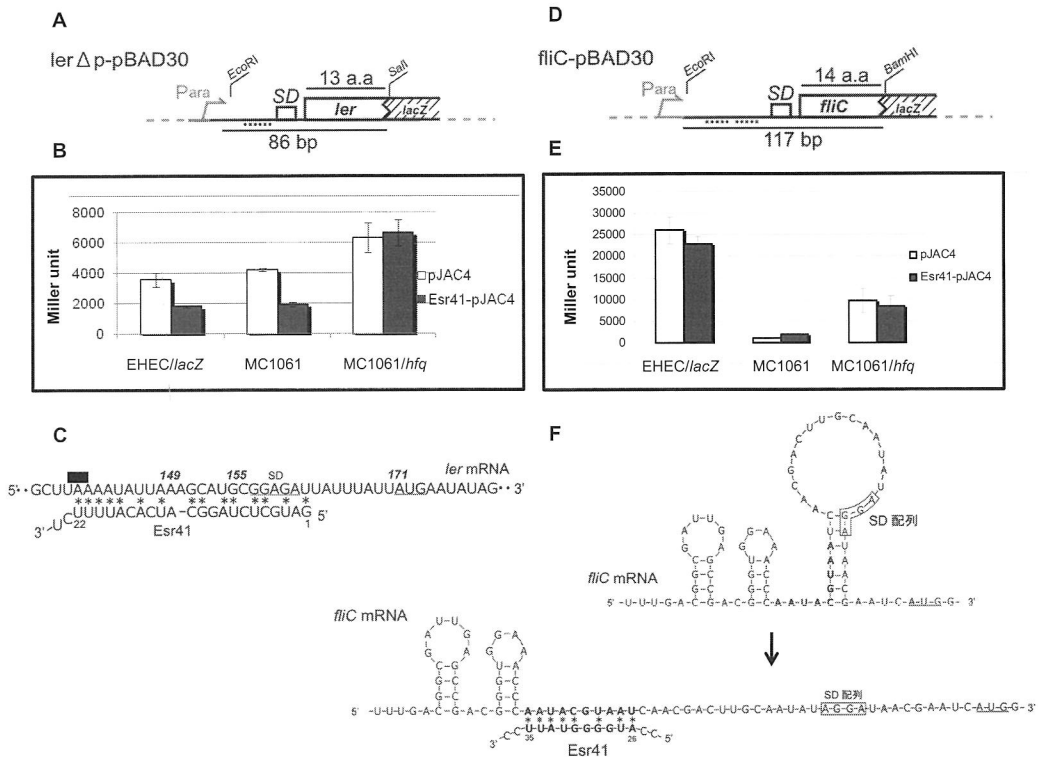


Fig. 8 Effects of Esr41 on translational activity of predicted target genes. (A) A schematic representation of *ler* Δ p-pBAD30 in that 5'UTR, a ribosomal binding site and 13 bp of the N terminus of *ler* are spaced in front of *lacZ*. Dashed line indicates the sequence to which Esr41 is predicted to bind. (B) Translation of *lacZ* from *ler* Δ p-pBAD30 was assessed with or without Esr41. The following strains were used: EHEC/*lacZ*, K-12 strain, MC1061 or MC1061/*hfq*. (C) Possible base pairings between *ler* mRNA and Esr41. In the sequence of *ler* mRNA Shine-Dalgarno sequence is boxed and start codon is underlined. (D) – (F) Analysis for translation activity of *fliC*-pBAD30 in the presence and absence of Esr41, as in (A) – (C).

での *ler-lacZ* 由来の β -ガラクトシダーゼ活性は pJAC4 存在下での活性の半分程度まで低下し (Fig. 8A), この効果は K-12 株と O157 株の両方でみられたことから (Fig. 8A), Esr41 は *ler* を標的としてその翻訳活性を抑制すると予想された. Esr41 のアンチセンスとしての可能性をさらに検討し, 制御機構に必要な *ler*-mRNA 上の配列を同定するため, mRNA に変異を施し, その影響を同様にレポーターアッセイにより解析した. その結果, Esr41 と相補的な領域 (Fig. 8C) を欠失させた場合に, Esr41 による翻訳抑制効果が消失した (データ非掲載). また, アンチセンス機構による翻訳抑制は, 標的遺伝子の mRNA の分解を伴うことが知られている (Aiba, 2007; Waters & Storz, 2009). Esr41-pJAC4 存在下での *ler-lacZ* の mRNA 量をリアルタイム PCR 法で解析したところ, その mRNA 量が著しく減少していた (データ非掲載). 以上の結果から, Esr41 は mRNA との相補配列を介したアンチセンス機構により LEE の主要な転写因子である *ler* の翻訳活性を抑制することで, LEE の全体的な発現を抑えていると予想される (Fig. 6). 同時に, Esr41 はべん毛レギュロンのリプレッサーでもある *ler* の発現を抑制することで, LEE とべん毛レギュロンをつなぐ GrlA/R を介してべん毛タンパク質の発現を促進すると考えられる (Fig. 6). 2つの異なる遺伝子群に作用する *ler* を標的とすることで, LEE とべん毛レギュロン両方の遺伝子群全体の発現制御が可能となっているのだ

ろう.

Esr41 は *ler* との相補配列とは別の領域を用いて, *flhD* または *fliC* の翻訳を促進すると予想される (Fig. 1B, Fig. 8F). K-12 株を用いたレポーターアッセイの結果, *fliC-lacZ* 由来の β -ガラクトシダーゼ活性が, Esr41-pJAC4 存在下では, pJAC4 の 2 倍程度に上昇したことから (Fig. 8E), Esr41 は *fliC* を標的としてその翻訳活性を促進することが示された. また, アンチセンス機構による翻訳促進には, 標的遺伝子の mRNA の安定化を伴う. わずかではあるが, Esr41-pJAC4 存在下での *fliC-lacZ* の mRNA 量に増加がみられたことから (データ非掲載), 翻訳促進に伴う *fliC-lacZ* の mRNA の安定化が起きていると予想される. 以上の結果から, Esr41 は *fliC*-mRNA との相補配列を介したアンチセンス機構により, その翻訳活性を促進していると予想される. 一方, Sakai 株を用いたアッセイでは, そのような翻訳促進効果はまったくみられなかった (Fig. 8E). Sakai 株細胞内での FliC の発現量は K-12 株に比べて非常に高く, 生育ステージにも影響を受けるため, 翻訳制御効果を観察できる適正な生育ステージでの解析が困難であると考えられる.

ncRNA と Hfq との相互作用の解析 バクテリアの多くの ncRNA は RNA シャペロンである Hfq タンパク質と結合する. 特にアンチセンスとして機能する ncRNA にとって, ncRNA の安定性に加え, ターゲッ

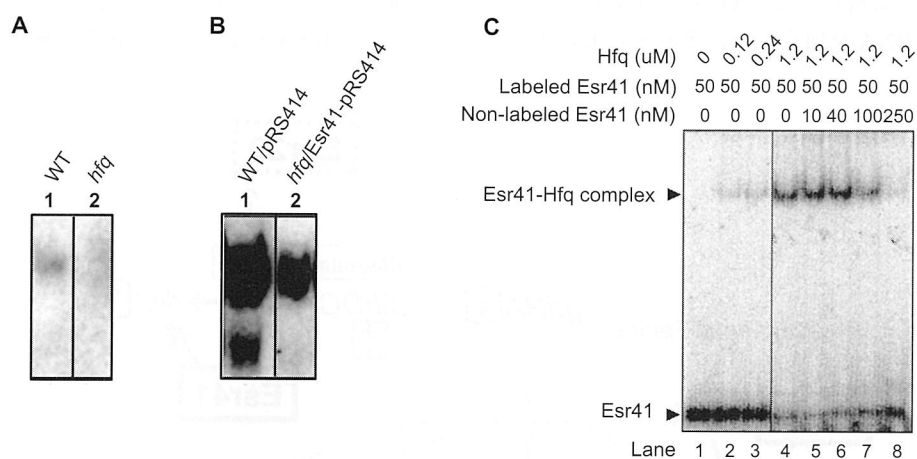


Fig. 9 Interaction between Esr41 and Hfq. (A), (B) Analysis of Esr41 stability depending on Hfq. EHEC strains were grown in DMEM at 37°C to an O.D.₆₀₀ of 0.5. Crude RNA was extracted as described in materials and methods, and then Northern blot analysis was performed. (C) Binding analysis of Hfq to Esr41 by the gel-shift assay. Effects of the concentration of Hfq and non-labeled Esr41 on the Esr41-Hfq complex are shown. Binding reaction was performed at 37°C for 30 min. in a binding buffer of 50 mM Tris (pH 7.5), 250 mM NH₄Cl and 10 mM MgCl₂ using indicated amounts of Hfq protein and 50 nM of ³²P-labeled *in vitro* transcript of Esr41. The concentration of non-labeled Esr41 used in competition assay is indicated (lane 4-8).

トとなる遺伝子の mRNA と塩基対合して翻訳制御を行う上で Hfq は必須の因子である (Valentin-Hansen *et al.*, 2004; Waters & Storz, 2009; Chao & Vogel, 2010). したがって, アンチセンスとして機能することが強く示唆された Esr41 が Hfq と相互作用し, その機能と安定性に Hfq が重要な役割を果たす可能性は高い. *hfq* を欠損した Sakai 株の RNA を用いたノザン解析の結果, Esr41 は Hfq 依存的に安定化されることが分かった (Fig. 9A, B). また, Hfq のリコンビナントタンパク質と, Esr29 または Esr41 の *in vitro* 転写物を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ, Esr29 (データ非掲載) も Esr41 (Fig. 9C) も Hfq と複合体を形成した. 競合アッセイでは, 放射性同位体で標識した Esr41 と Hfq との複合体形成が, 非標識の Esr41 の添加によって量依存的に阻害された (Fig. 9C). Esr29 と Esr41 の機能に Hfq が必要かどうかを調べるため, Hfq 欠損株を用いて *ler-lacZ* 融合体および *fliC-lacZ* 融合体のレポーターアッセイを行った. その結果, Esr41 の *ler* に対する翻訳抑制効果 (Fig. 8A) および Esr41 の *fliC* に対する翻訳促進効果 (Fig. 8B) が, *hfq* 欠損株ではみられなくなった. 以上の結果から, Esr41 が Hfq 依存的に安定化していること, また Esr41 による標的遺伝子の翻訳制御機構には Hfq が必須であることが分かった.

考 察

本研究ではゲノム解析により O157 Sakai 株特異的な数種の新規 ncRNA を同定した. そのうち Esr29 と

Esr41 は, 宿主細胞への初期接着において逆相関的に発現する LEE およびべん毛レギュロンという 2 つの遺伝子群を制御していることが明らかとなった. 本研究結果は, EHEC Sakai 株特異的な低分子 RNA が病原性発現制御に直接関与していることを示した初めての例である.

標的遺伝子の同定と作用機作の解析を行った結果, Esr41 は RNA シャペロンである Hfq に依存して標的 mRNA に結合し, その翻訳活性を制御するアンチセンス RNA として機能する可能性が高いことが分かった. レポーターアッセイにより, Esr41 の標的遺伝子は, LEE の発現を正に制御する転写因子 *ler* とべん毛タンパク質 *fliC* であることが分かった (Fig. 10). Esr41 は, 細胞接着において中心的な役割を果たす LEE 遺伝子群を統括する転写因子 Ler を負に制御することで, LEE 全体の発現を抑制する. この Esr41 の Ler に対する抑制効果は同時に, べん毛レギュロンのリプレッサーである GrlA/R を介して, べん毛遺伝子群の発現抑制を解除, すなわち発現を促進する効果へと変換される. さらに Esr41 は FliC を直接標的としてその発現を促進している. すなわち, Esr41 は Ler と FliC の制御を通してべん毛レギュロンを正に制御する. このように, Esr41 は宿主細胞への初期感染において中心的な役割を果たす LEE とべん毛レギュロンの逆相関的な発現制御に直接的に関与していることが明らかとなった. 病原性という 1 つの生命現象に関わる, 2 つの異なる標的遺伝子への相補性を Esr41 がどのように獲得したかは不明であるが, 病原性の制御機構だけでなく, RNA 分子の機能と構造の進化を考える上でも

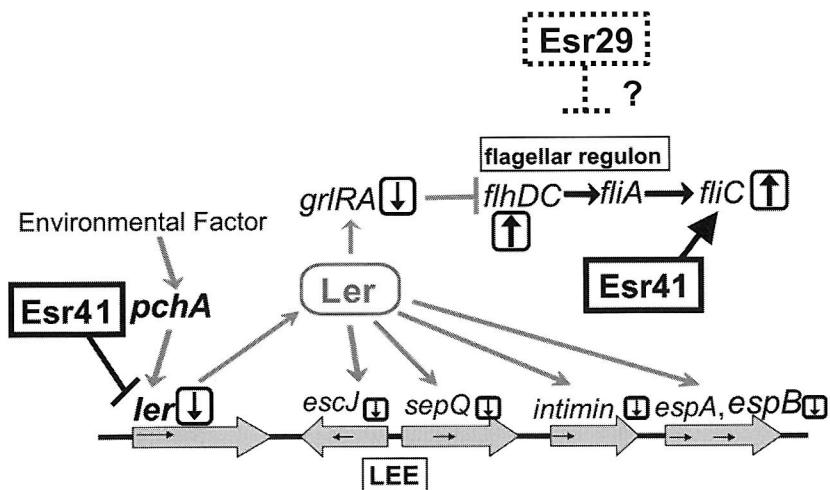


Fig. 10 Model for ncRNA-mediated regulation of LEE and flagella regulon in EHEC O157:H7 Sakai. Black arrows and the lines represent predicted positive and negative regulation, respectively. The mechanism by which Esr29 represses flagellar regulon is unclear yet.

非常に興味深い。複数の ncRNA が同一の遺伝子を標的としている例や、一つの ncRNA が複数の遺伝子を標的とする例はこれまでも報告されており (Waters & Storz, 2009), ncRNA による遺伝子発現制御機構がバクテリアにとって重要であり、また利用しやすいシステムであったことを示唆しているのかもしれない。

Esr29 によるべん毛レギュロンの総括的な翻訳抑制のメカニズムは明らかにできなかった。また、直接の標的遺伝子を同定できなかったが、これまでの実験結果から Esr29 がべん毛レギュロンを負に制御していることは間違いない (Fig. 10)。今後、あらたな手法によるアプローチが必要である。Esr29 および Esr41 は EHEC の生育や病原性発現には非必須であり、その欠損株において表現型への顕著な影響は観察されなかった。これは LEE およびべん毛レギュロンの他のカスケードや、あるいは他の因子が Esr29 と Esr41 の役割を相補するためかもしれない。

バクテリアの細胞増殖の効率化のため、また、宿主の免疫系よる攻撃を免れるため、病原性因子の発現は適切なタイミングで行われる必要がある。ヒト腸管内で病原性を発揮する EHEC には、当然ながらそのための環境応答システムが備わっている必要がある。EHEC の病原性遺伝子は、ファージなど可動遺伝因子を介した水平伝搬により運び込まれた外来の遺伝子群に由来する。さまざまな時期に獲得されて病原性大腸菌のゲノム上にモザイク状に存在する外来遺伝子群は、非病原性大腸菌にも共通して存在する環境応答システムに加え、病原性調節因子を介した同調的な発現制御システムによって、巧妙に制御されている (戸邊, 2007)。本研究結果は、この複雑かつ精緻な制御機構に、外来の「小さな RNA 分子」が直接的に関与していることを示したものであり、Esr29 および Esr41 は、EHEC が環境変化に対してより適切に応答するための微調整 (fine-tuning) を行う機能分子としての役割を担っているのだろう。O157:H7 sakai 以外の EHEC をはじめ、病原性細菌にはべん毛を持たないものも多く、べん毛の有無が接着効率や病原性の強さと直接的な相関性を示すわけではない。LEE とべん毛レギュロンの両方を標的とする Esr41 は O157:H7 以外では同定されていないが、べん毛を持たない病原性細菌においても、LEE にのみ作用を及ぼすことで初期接着の制御に関与するような同様の作用機作をもつ ncRNA が存在するかもしれない。

アンチセンス機構による翻訳レベルでの遺伝子発現調節機構は、バクテリアでよく知られた現象である。既知のアンチセンス RNA と標的 mRNA の相互作用する領域は数十塩基対と長い。一方、本研究で同定され

た Esr29 および Esr41 の標的遺伝子に対する相補性は 10, 22 または 25 塩基と比較的短く (Fig. 1), 既存の標的遺伝子検索ソフトウェアでは標的遺伝子を検出できなかった。しかし、大腸菌の糖代謝経路で機能するアンチセンス機構 (SgrS/ptsG-mRNA) において、アンチセンス RNA (SgrS) の相補性領域 (ミスマッチ塩基対を含む) 31 塩基のうち 14 塩基対が翻訳抑制効果に十分であることが、牧らによって報告されている (Maki *et al.*, 2010)。したがって、本研究で同定された Esr29 および Esr41 の相補配列にもとづく標的遺伝子の翻訳制御機構は十分に可能であり、天然の small RNA としては、最も短い相補配列によるアンチセンス効果を示した例といえる。

本研究結果は、EHEC の病原性の発現制御機構やその分子メカニズムを理解する上での基礎的知見を与えるものであり、同時に、近年注目を集めている「小さな RNA 分子」による病原性遺伝子発現制御機構のあらたな一例を提示するものである。

要 約

腸管出血性大腸菌 (enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC) はヒトを宿主とする下痢病原性大腸菌の一種である。EHEC のゲノム解析から、LEE 病原性に関わる多くのタンパク質遺伝子の存在が明らかにされているが、その複雑な発現制御機構には不明な点も残されている。一方で、近年、タンパク質をコードせず、それ自身で機能を持つ非翻訳型 RNA (non-coding RNA; ncRNA) が様々な生物種の生命現象において重要なはたらきを担っていることが明らかとなっている。EHEC の ncRNA についての報告は未だ見当たらないが、EHEC の病原性の発現機構におけるブラックボックスを解明する鍵が ncRNA である可能性は高い。我々は EHEC O157 Sakai 株特異的な ncRNA の探索と機能解析を行い、数種の新規 ncRNA を同定した。そのうちの 2 つ (Esr29, Esr41) は、EHEC の宿主細胞への初期接着において中心的なはたらきを担う LEE (locus of enterocyte effacement) とべん毛レギュロンという 2 つの遺伝子群の逆相関的な発現制御機構に関与していることが分かった。Esr29 および Esr41 変異株の解析を行ったところ、Esr29 の過剰発現株ではべん毛レギュロンの発現抑制が、Esr41 の過剰発現株ではべん毛レギュロンの発現促進および LEE 遺伝子群の発現抑制が観察された。標的遺伝子の同定と作用機作の解析を行った結果、Esr41 は RNA シャペロンである Hfq に依存して標的 mRNA に結合し、その翻訳活性を制御するアンチセンス RNA として機能することを

明らかにした。Esr29によるべん毛レギュロンの総括的な翻訳抑制のメカニズムは明らかにできなかった。本研究結果は、EHEC Sakai 株特異的な低分子 RNA が病原性発現制御機構に直接関与していることを示した初めての例である。

本助成で得られた成果の報告

口頭発表

- 1) 須藤直樹, 相馬亜希子, 伊豫田淳, 大島拓, 戸邊亨, 林哲也, 関根靖彦 (2011). 病原性大腸菌 O157 株特異的な non-coding RNA #41 の標的遺伝子の同定, 及び作用機構の解明. 第8回21世紀大腸菌研究会, 長野.
- 2) 相馬亜希子, 伊豫田淳, 須藤直樹, 喜田祐介, 大島拓, 武藤あきら, 徐麻由美, 大戸結衣, 戸邊亨, 大西真, 小椋義俊, 安倍裕順, 林哲也, 関根靖彦 (2009). 病原性大腸菌 O157:H7 sakai 株における non-coding RNA の機能解析. 2009年ゲノム微生物学会若手の会, 東京.
- 3) 須藤直樹, 相馬亜希子, 徐麻由美, 大戸結衣, 伊豫田淳, 大島拓, 武藤あきら, 栗原那奈子, 大西真, 林哲也, 関根靖彦 (2009). 病原性大腸菌 O157 株特異的な non-coding RNA の同定と機能解析. 第6回21世紀大腸菌研究会, 静岡.
- 4) 相馬亜希子, 徐麻由美, 伊豫田淳, 武藤あきら, 栗原那奈子, 大西真, 林哲也, 安倍裕順, 戸邊亨, 牛田千里, 黒川顕, 関根靖彦 (2008). 病原性大腸菌 O157 株特異的な non-coding RNA の同定と機能解析. 第5回21世紀大腸菌研究会, 静岡.
- 5) 相馬亜希子, 巴大輔, 久保田篤, 池内与志穂, 鈴木勉, 小林和夫, 小笠原直毅, 関根靖彦 (2008). tRNA^{Asp}に存在する修飾塩基イノシンの大腸菌と枯草菌における機能の解析. 日本 RNA 学会フロンティアミーティング, 京都.

ポスター発表

- 1) 須藤直樹, 相馬亜希子, 伊豫田淳, 徐麻由美, 大戸結衣, 大島拓, 戸邊亨, 関根靖彦 (2010). 病原性大腸菌 O157 株特異的な non-coding RNA #29, #41 の機能解析. 第33回日本分子生物学会年会, 神戸.
- 2) Kida, Y., Soma, A., Iyoda, S., Kurihara, N., Muto, A., Ohnishi, M., Abe, H., Tobe, T. & Sekine, Y. (2010). Functional analysis of non-coding RNAs with tRNA-like structure specific to *E. coli* O157:H7 Sakai. tRNA workshop, Portugal.
- 3) 喜田祐介, 相馬亜希子, 伊豫田淳, 栗原那奈子, 武藤あきら, 大西真, 安倍裕順, 戸邊亨, 関根靖彦 (2009). 病原性大腸菌 O157 株特異的な non-coding RNA #74 ファミリーの機能解析. 第32回日本分子生物学会年会, 神奈川.
- 4) 大戸結衣, 徐麻由美, 相馬亜希子, 伊豫田淳, 大西真, 林哲也, 関根靖彦 (2009). 病原性大腸菌 O157 株特異的な non-coding RNA, #29, #41 の機能解析. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜.
- 5) Soma, A., Suh, M., Iyoda, S., Muto, A., Kurihara, N., Hayashi, T., Abe, H., Ohnishi, M., Tobe, T., Kurokawa, K. & Sekine, Y. (2008). Identification and

functional analysis of non-coding RNAs from *E. coli* O157:H7. Miami winter symposium, U.S.A.

謝 辞

本研究の遂行にあたり, 多大なる助成を頂きました公益財団法人発酵研究所の関係者各位に心より御礼申し上げます。様々な実験の試行が可能となり, 本研究結果の多くが公益財団法人発酵研究所による助成のもとに得られたものです。また, 共同研究者であり, 実験施設の提供をはじめ有意義な意見交換や温かいご指導を頂いた, 国立感染症研究所・細菌第一部 伊豫田淳主任研究官, 大西真部長, 奈良先端大・情報科学大島拓助教, 宮崎大・医学部 林哲也教授, 小椋義俊助教, 弘前大・農学生命科学部 武藤あきら教授, 大阪大院・医学部 戸邊亨准教授, ならびに立教大・理学部 関根靖彦教授に深く感謝します。本研究は立教大学理学部生命理学科で行われ, 卒業研究として共同で研究を行った多くの学生の皆さま, 特に, 須藤直樹君, 中野雄太君, 喜田祐介君, 大戸結衣さん, 徐真由美さん, 栗原那奈子さんに感謝いたします。

文 献

- Abe, H., Tatsuno, I., Tobe, T., Okutani, A. & Sasakawa, C. (2002). Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* **70**: 3500-3509.
- Aiba, H. (2007). Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**: 134-139.
- Chao, C. & Vogel, J. (2010). The role of Hfq in bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**: 24-33.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **6**: 6640-6645.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**: 494-498.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. & Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J. Bacteriol.* **177**: 4121-4130.
- Hamilton, A. J. & Baulcombe, D. C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene

- silencing in plants. *Science* **286**: 950-952.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C. G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M. & Shinagawa, H. (2001). Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* **8**: 11-22.
- 林 哲也 (2003). ゲノムからみた病原菌. *日本臨床* **61**: 414-422.
- 飯田 哲也, 本田 武司 (2001). 大腸菌志賀 (ベロ) 毒素の構造と標的細胞に対する作用. *生物間の攻撃と防御の蛋白質* 478-483.
- Iyoda, S. & Watanabe, H. (2005). ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**: 4086-4094.
- Iyoda, S., Koizumi, N., Satou, H., Lu, Y., Saitoh, T., Ohnishi, M. & Watanabe, H. (2006). The GrlR-GrlA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**: 5682-5692.
- 伊豫田 淳, 渡邊 治雄 (2004). 腸管出血性大腸菌の病原性の分子機序. *化学療法の領域* **20**: 59-64
- Jaurin, B. (1987). A promoter probe vector (pJAC4) that utilizes the ampC beta-lactamase gene of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **15**: 8567.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:123-140.
- Maki, K., Morita, T., Otaka, H. & Aiba, H. (2010). A minimal base-pairing region of a bacterial small RNA SgrS required for translational repression of ptsG mRNA. *Mol. Microbiol.* **76**: 782-792.
- Mellies, J. L., Barron, A. M. & Carmona, A. M. (2007). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infect Immun.* **75**: 4199-4210.
- Ogura, Y., Ooka, T., Iguchi, A., Toh, H., Asadulghani, M., Oshima, K., Kodama, T., Abe, H., Nakayama, K., Kurokawa, K., Tobe, T., Hattori, M. & Hayashi, T. (2009). Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **106**: 17939-17944.
- Ohnishi, M., Kurokawa, K. & Hayashi, T. (2001) Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends Microbiol.* **9**: 481-485.
- Perna, N. T., Plunkett, G. 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J., Kirkpatrick, H. A., Pósfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E. J., Davis, N. W., Lim, A., Dimalanta, E. T., Potamou, K. D., Apodaca, J., Anantharaman, T. S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D. C., Welch, R. A. & Blattner, F. R. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**: 529-533.
- Raghavan, R., Groisman, E. A. & Ochman, H. (2011). Genome-wide detection of novel regulatory RNAs in *E. coli*. (in press).
- Sampson, J. R. & Uhlenbeck, O. C. (1988). Biochemical and physical characterization of an unmodified yeast phenylalanine transfer RNA transcribed in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **85**: 1033-1037.
- Schmidt, M. A. (2010). LEE ways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell Microbiol.* **12**:1544-1552.
- Simons, R. W., Houman, F. & Kleckner, N. (1987). Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene.* **53**: 85-96.
- 立野 一郎 (2007). 腸管出血性大腸菌 O157:H7 の人腸管上皮細胞への付着に関する研究. *日本細菌学雑誌* **62**: 247-253.
- Tjaden, B., Goodwin, S. S., Opydyke, J. A., Guillier, M., Fu, D. X., Gottesman, S. & Storz, G. (2006). Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria. *Nucleic Acids Res.* **34**: 2791-2802.
- Tjaden, B. (2008). TargetRNA: a tool for predicting targets of small RNA action in bacteria. *Nucleic Acids Res.* **36**: W109-113.
- Toledo-Arana, A., Repoila, F. & Cossart, P. (2007). Small noncoding RNAs controlling pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**:182-188.
- 戸邊 亨 (2007). 病原性大腸菌および赤痢菌における環境応答による病原性発現調節. *日本細菌学雑誌* **62**: 337-346.
- 戸邊 亨 (2008). 腸管出血性大腸菌 (EHEC) の病原性, 病態に関わる研究のその後の進展. *化学療法の領域* **24**: 101-107.
- Valentin-Hansen, P., Eriksen, M. & Udesen, C. (2004). The bacterial Sm-like protein Hfq: a key player in RNA transactions. *Mol. Microbiol.* **51**: 1525-1533.
- Waters, L. S. & Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136**: 615-628.

インフルエンザウイルスによる糖鎖受容体認識の多様性と 宿主域を規定する分子基盤の解明

鈴木 隆

静岡県立大学 薬学部

〒422-8526 静岡市駿河区谷田52番1号

The molecular basis for regulating the diversity of receptor sugar recognition by influenza virus and the virus' host range

Takashi Suzuki

Department of Biochemistry, School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka
and Global COE Program, 52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Shizuoka

Influenza virus hemagglutinin (HA) attaches to sialoglycoconjugates (glycoproteins and glycolipids containing sialic acid) on the host cell surface to initiate infection. The binding specificity of influenza A virus (IAV) for sialyloligosaccharide moieties on the cell surface is a critical factor for acquiring transmission ability to different host species. Two major molecular species of sialic acid, 5-N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) and 5-N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc), are chemically distinguished by a functional group at the C-5 position. Neu5Gc is derived from enzymatic hydroxylation of the N-acetyl group of Neu5Ac by CMP-Neu5Ac hydroxylase. Glycoconjugates containing Neu5Gc are expressed in many animal tissues, whereas they cannot be synthesized in normal human tissues owing to a lack of the N-terminus of the CMP-Neu5Ac hydroxylase gene. Determination of the molecular mechanisms of sialic acid recognition by influenza virus will help to clarify the roles of sialic acids in cell tropism and host transmission of IAV, leading to useful information for the development of anti-influenza virus agents. We found that single amino acid substitutions of H3 HA at position 155 from Thr to Tyr and at position 158 from Glu to Gly play a critical role in the recognition of two major molecular species of sialic acids.

In the present study we also examined sulfatide, which is abundantly expressed in various mammalian organs, including the intestine and trachea, in which IAVs replicate. However, the function of sulfatide in IAV infection remains unknown. Sulfatide is synthesized by two transferases, ceramide galactosyltransferase (CGT) and cerebroside sulfotransferase (CST), and is degraded by arylsulfatase A (ASA). In this study, we demonstrated that sulfatide enhanced IAV replication through efficient translocation of the newly synthesized IAV nucleoprotein (NP) from the nucleus to the cytoplasm, by using genetically produced cells in which sulfatide expression was down-regulated by RNA interference against CST mRNA or overexpression of the ASA gene and in which sulfatide expression was up-regulated by overexpression of both the CST and CGT genes. Our findings provide new insights into IAV replication and suggest new therapeutic strategies.

Key words: Influenza virus, hemagglutinin, sialic acid, sulfatide

緒 言

インフルエンザウイルスはオルソミクソウイルス科に属すマイナス鎖 RNA ウイルスで、ウイルス粒子内部にある核タンパク質 (nucleoprotein: NP) とマトリックスタンパク質 (matrix protein: M1, M2) の抗原

E-mail: suzuki@u-shizuoka-ken.ac.jp

共同研究者: 高橋忠伸 (静岡県大・薬), 石田秀治, 木曾真 (岐阜大・応用生物), 河岡義裕 (東大医科研・ウイルス感染分野)

性によって、A, B, C の3つの型に分類されている。インフルエンザは世界で最も広く存在する人獣共通感染症の一つである。インフルエンザの大流行（パンデミック）は、カモなど野生の水トリに由来するインフルエンザA型ウイルス（IAV）が、家禽やブタなどを介してヒトへ伝播する過程で変異やウイルス間での遺伝子交雑を繰り返すことで病原性を獲得し、ヒト-ヒト間で感染可能となった新型ウイルスが世界的規模で流行したものである。前世紀だけでも、1918年（スペインかぜ）、1957年（アジアかぜ）、1968年（ホンコンかぜ）、1977年（ロシアかぜ）など4回にわたる。特に、1918年のパンデミックでは、世界中で2000万から4000万の人命が奪われている（Webster *et al.*, 1992）。さらに、1997年に香港でH5N1型高病原性のトリIAVが直接ヒトに伝播し、18例の患者が報告されて6名の死亡が確認された。このウイルスはその後も感染域を拡大しており、2010年5月までにインドネシア、ベトナム、エジプトを中心に490名以上が感染し、290名以上の死亡が確認されている（Enserink, 2006; Webster *et al.*, 2006）。また2009年には新たにブタ由来のH1N1型ウイルスが出現し、少なくとも全世界で15000人以上の死亡が報告されている（Neuman *et al.*, 2009）。

インフルエンザウイルスは、宿主細胞由来の脂質二重膜からなる外殻（エンベロープ）をもち、A型とB型ウイルスには、外殻表面に宿主の受容体（シアル酸を含む特定の糖鎖）へ結合するヘマグルチニン（hemagglutinin: HA）とその受容体の破壊酵素（シアリダーゼ）作用をもつノイラミニダーゼ（neuraminidase: NA）の2種類の糖タンパク質がスパイク状に突き出している（Fig. 1）。インフルエンザウイルスの複製は、1) 宿主細胞膜受容体への吸着とエンドサイトーシスによるウイルス粒子の細胞内への取り込み、2) エンドゾーム内での酸性pHにおけるウイルス膜とエンドゾーム膜の融合に伴ったウイルス粒子の脱殻（uncoating）、3) ウイルスRNAの転写と複製、4) ウイルス粒子の形成（assemblyあるいはpackaging）と出芽（budding）の4段階からなる（Fig. 2）。

IAVは、HAを介して、宿主細胞膜表面のシアル酸含有糖鎖に吸着し侵入を開始する。IAVの結合親和性は、シアル酸の分子種、シアル酸と糖鎖非還元末端から2番目のガラクトース（Gal）との結合様式、3番目以降の糖鎖配列に依存する。シアル酸結合様式の異なる糖鎖へのウイルスHAの結合特異性は、カモ由来ウイルスとヒト由来ウイルスでは大きく異なっており、ウイルスの感染性や宿主域を規定する重要な因子の一つと考えられている（Suzuki, 2005）。一方、天

然に存在する主要なシアル酸分子種としてN-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）とN-グリコリルノイラミン酸（Neu5Gc）が知られている（Fig. 3）。これらシアル酸分子種に関するHAの結合性と感染性との関連は、ウマインフルエンザウイルスを除いてほとんど明らかになっていない（Suzuki *et al.*, 2000）。またIAVはシアル酸を含有しない硫酸化糖脂質の一種であるスルファチド（sulfatide）にも結合することが判明している（Suzuki *et al.*, 1996）。

細胞膜上のスフィンゴ糖脂質、コレステロール、スフィンゴミエリンに富むlipid raftsと呼ばれる機能的マイクロドメインが、多くのウイルス感染に関与している。硫酸化糖脂質の一種であるsulfatideはlipid raftsに存在し、ウイルスの標的となる気管支やウイルス分離に汎用されているMDCK細胞などの腎臓由来上皮細胞に豊富に存在するが、ウイルス感染における役割は良く解っていない。スルファチドは一般に、セラミドからceramide galactosyltransferase（CGT）と

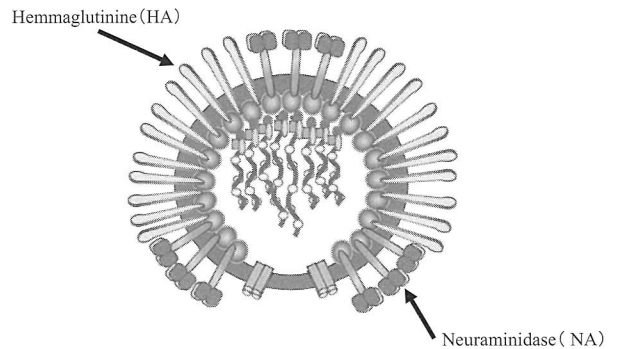


Fig. 1 Structure of influenza A virus.

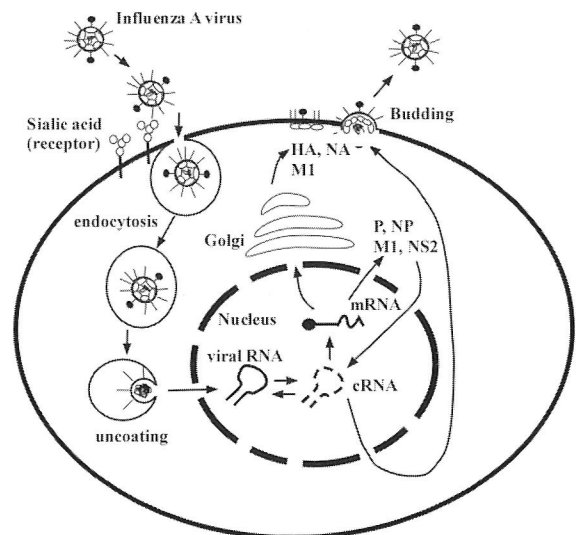
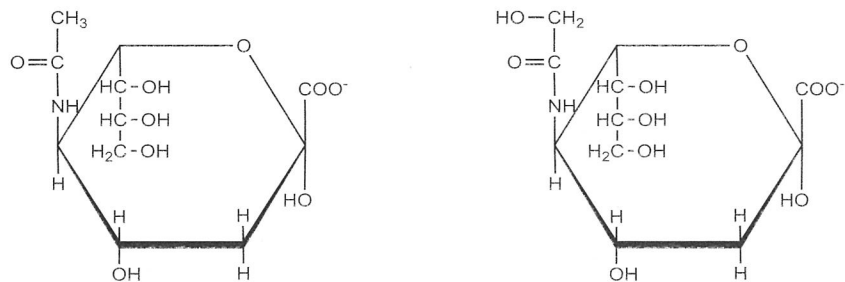


Fig. 2 Replication cycle of influenza A virus.



N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac)

N-glycolylneuraminic acid (Neu5Gc)

Fig. 3 Structure of *N*-acetyl and *N*-glycolylneuraminic acids.

These molecules differ at position 5 of the pyranose ring. *N*-acetylneuraminic acid is the precursor of *N*-glycolylneuraminic acid; enzymatic hydroxylation of the former results in the latter.

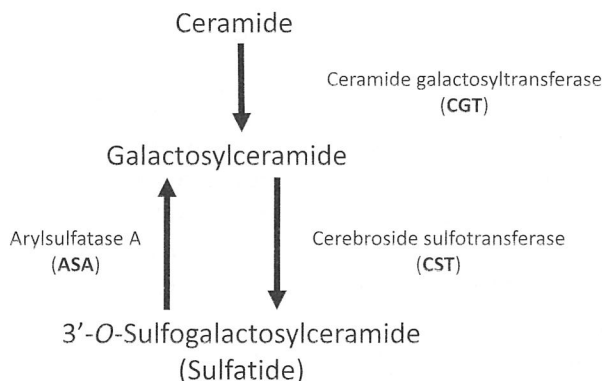


Fig. 4 Metabolism of sulfatide synthesis and degradation.

cerebroside sulfotransferase (CST)を利用する二段階の転移酵素反応によって生合成される (Fig. 4)

(Honke *et al.*, 1997; Kapitonov *et al.*, 1997). 一方, 生体内のスルファチドは, 脱硫酸化酵素の一種であるarylsulfatase A (ASA)により分解される (Stein *et al.*, 1989). 本研究は, HAの糖鎖認識の多様性とIAV感染における役割を明らかにするために, HAのシアル酸分子種の認識機構とIAV感染における sulfatideの機能とHAとの関係を明らかにすることで, IAVの感染・伝播におけるHAの機能を解明することを目的とした.

実験方法

モノクローナル抗体の調製 当研究室で作製したスルファチドに対するIgM抗体 (以下, GS-5と省略) および globotriaosylceramide (Gb3Cer) に対するIgM抗体 (以下, TU-1と省略)を産生するハイブリドーマの無血清培地 (Invitrogen) 培養上清を用いた.

抗NP抗体 (4E6), 抗H3 HA抗体 (2E10, 1F8) および抗NA抗体 (SI-4)は, A/Memphis/1/71 (H3N2) および A/Japan/305/57 (H2N2) を免疫したマウスから以前報告した方法によって作製した (Miyamoto *et al.*, 1997).

MDCK細胞によるウイルスの培養 MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)細胞を37°C, 5%CO₂で5% fetal bovine serum (FBS) 含有MEM (medium essential medium: GIBCO)で培養しコンフルエントな状態にした. その上清を除き, SFM (serum free medium)で2回洗浄した後, 2² hemagglutinating unit (HAU)に希釈したウイルスを感染させ, 34°C, 1時間培養した. アセチルトリプシン (μg/mL)を含んだSFMを加え, 34°C, 48時間培養した. 上清を遠心チューブに移し, 4°C, 3000 rpm, 10分間遠心し, 挟雑物を遠沈除去した. さらに, 4°C, 10000 rpm, 3時間遠心し, 得られたウイルス沈殿を20%グリセロール-PBSで懸濁して, ウイルス濃縮液とした.

H3HA 遺伝子を含む RNA ポリメラーゼ I 駆動性プラスミドの作成 精製インフルエンザウイルス A/Memphis/1/71 (H3N2) 株 (214~215 HAU) (20 μ L) を RNA 抽出試薬 TRIZOL (Invitrogen) (1 mL) に加え、激しく振盪し、常法に従ってウイルスゲノム RNA の抽出を行った。次に、TaKaRa RNA PCR Kit Ver.2.1 を用いて RT-PCR によりインフルエンザウイルス HA 遺伝子を増幅した。さらに、GENECLEAN Turbo Kit (MP Biomedicals) を用いて HA 遺伝子とプラスミドの精製を行った。次に、インフルエンザウイルス HA 遺伝子 (4 μ L) とプラスミド (0.5 μ L) を混合し、TaKaRa Ligation Kit Ver.2 を用いてライゲーションを行った。さらに、同キットの Solution III (1 μ L) を加えた反応溶液をコンピテント細胞 [E. coli DH5a] (20 μ L) へ加え、トランスフォーメーション後、LB 寒天プレートへ塗布し、37 $^{\circ}$ C、一晚培養した。さらに、この大腸菌の培養液 (1.5 mL) を 1.5 mL マイクロチューブに移し、4 $^{\circ}$ C、10000 rpm、3 分間遠心後、上清を除いた。Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) キットを用いてプラスミド精製 (ミニプレップ) を行った。

点変異 HA 遺伝子を含むプラスミドの構築 上記精製プラスミド 1 μ L を、10 x pfu DNA polymerase buffer (2 μ L)、2.5 mM dNTP mix (1.6 μ L)、各点変異プライマー [137R (F), 144R (F), 155R (F), 158R

(F), 193R (F)] (5 pmol/ μ L) (各々 1 μ L) および High-fidelity Ultra pfu DNA polymerase (STRATAGENE) (0.5 μ L) 混合溶液に加えた。PCR 装置を用いて、95 $^{\circ}$ C-2 分間後、変異導入 PCR 95 $^{\circ}$ C-1 分間、55 $^{\circ}$ C-1 分30秒間、68 $^{\circ}$ C-8 分間のサイクルを 18 回繰り返して 4 $^{\circ}$ C に冷却した。PCR 反応液に、制限酵素 DpnI (0.5 μ L) を加え、37 $^{\circ}$ C、1 時間消化した。制限酵素処理済 PCR 反応液 2 μ L を用いて同様にライゲーションとトランスフォーメーションを行った。このプラスミドを精製し、HA の 5 カ所のアミノ酸を点変異 (N137Y, G144D, T155Y, E158G, S193N) させた点変異 HA ゲノム発現プラスミドを得た。

リバーシジェネティクス法によるインフルエンザ A 型ウイルスの作製 D-MEM 培地 (10%FBS 含有) で 24 ウェルプレートに継代した 293T 細胞へ、発現プラスミド pcDNA762 (PB2 発現), pcDNA774 (PB1 発現), pcDNA787 (PA 発現), pCAGGS-WSN-NP0/14 (NP 発現), RNA ポリメラーゼ I 駆動性プラスミドを添加後、HA ゲノム発現プラスミドを各 1 遺伝子ずつ、合計 12 本のプラスミド [発現プラスミド (各々 0.5 μ g/well), RNA ポリメラーゼ I 駆動性プラスミド (各々 0.2 μ g/well)] を TransIT-293 (7.2 μ L/well) を用いて同時に導入した。37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下 4 時間培養した後、OPTI-MEMI 培地 (Invitrogen) へ交換し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 条件下 48 時間培養した。この培養上清を

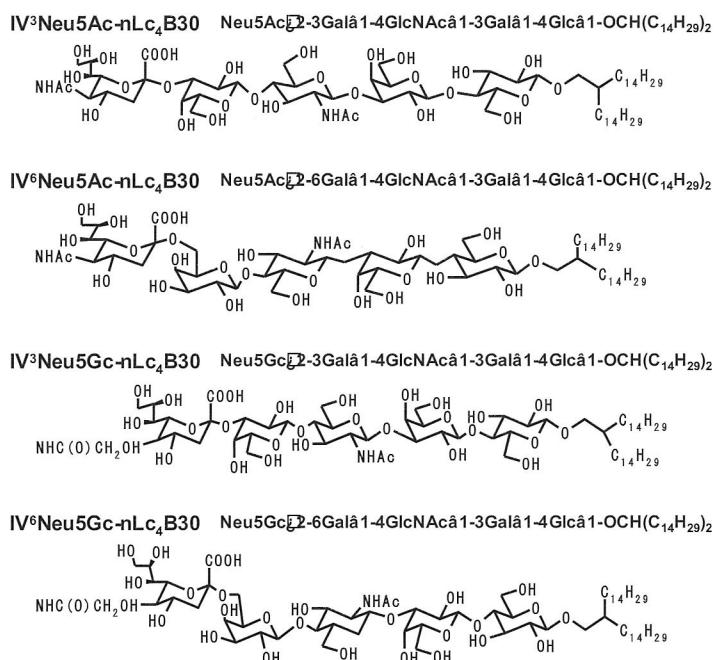


Fig. 5 Carbohydrate structures of synthetic glycolipids.

用いて、プラークアッセイにより、5種類 (N137Y, G144D, T155Y, E158G, S193N) の点変異ウイルスを得た。

TLC/virus overlay assay による結合特異性の測定
シリカゲル TLC プレート (Polygram Sil G, Marchery Nagel) 上にシアル酸結合様式とシアル酸分子種が異なる4種類の合成糖脂質 (Fig. 5) (各々 1.0 nmol) をスポットし, Chloroform/Methanol/0.2%CaCl₂ in water = 65/35/8 (v/v/v) 中で展開した。風乾後, 1%Ovalbumin と 1%polyvinylpyrrolidone (PVP) 含有 PBS 溶液で, 室温, 2時間ブロッキングを行なった。PBS で5回洗浄後, インフルエンザウイルスの PBS 懸濁液 (2¹⁰ HAU) を加え 4℃, 一晩振盪した。これを PBS で5回洗浄し, 3%PVP-PBS 溶液で200倍希釈した抗ウイルス抗体 (USA1) を加え, 4℃, 2時間振盪した。このプレートを PBS で5回洗浄し, 3%PVP-PBS 溶液で2000倍希釈した horse radish peroxidase 標識 ProteinA を加え, 4℃, 2時間振盪した。TLC プレートを PBS で洗浄後, DEPDA 発色液を加え, 室温で15分間振盪し, 合成糖脂質に結合したウイルスを検出した。

Solid-phase binding assay エタノールに溶解させた各合成糖脂質を 12.5 pmol から段階希釈し, マイクロプレート (1 x 8 Stripwell™ Plate, Corning) に加え, エタノール乾固後, プレートを上下逆さまにして 254 nm の紫外線を1分間照射し, 固相化した。1%Extra BSA -PBS を加え (250 μL/well), 4℃, 一晩ブロッキングした。プレートを 0.01%Tween20-PBS で5回洗浄した後, 210HAU に希釈したウイルス (50 μL/well) を加え, 4℃, 一晩静置した。抗 HA 単クローン抗体 (2E10) を加え, 4℃, 2時間静置した。0.01%Tween20-PBS で5回洗浄した後, 0.1%Extra BSA-PBS で3000倍に希釈した HRP 標識抗マウス IgG+M 抗体を加え (50 μL/well), 4℃, 2時間静置した。0.01%Tween20-PBS で5回洗浄した後, 発色基質を加え (100 μL/well), 15分間静置後, 1N 硫酸を加えて (50 μL/well) 反応を停止させ, 測定波長 492 nm, 対照波長 630 nm で比色定量した。

CGT, CST および ASA 遺伝子のクローニングと遺伝子導入変異細胞の作製 CGT, CST 遺伝子は, MDCK 細胞より 3'-および 5'-RACE 法により調製した。両遺伝子を pIRES-neo vector に挿入し, pIRES-CST-CGT vector を調製した。この遺伝子を COS-7 細胞へ導入し, G418 (1 mg/ml) 添加 DMEM で3週間

以上培養することで, sulfatide 高発現変異細胞株 (SulCOS1 および SulCOS2) を得た。ASA 遺伝子は PCR 法により HeLa 細胞から調製した。この遺伝子を最終的に pTriEx3-neo vector に挿入し, pTriEx3-ASA vector を調製した。この遺伝子を MDCK 細胞へ導入し, G418 (1 mg/ml) 添加 DMEM で3週間以上培養することで, ASA 高発現変異細胞株を得た。

CST mRNA に対する RNAi CST 遺伝子の 401-419 番目の cDNA 配列ならびに, 陰性対照として CST の 337-357 番目の cDNA 配列および GFP の 29-47 番目の cDNA 配列を siRNA 用の発現 vector pSilencerTM3.1-H1 neo に挿入した。これら vector を MDCK 細胞へ導入し, G418 (1 mg/ml) 添加 DMEM で3週間以上培養することで, 変異細胞株を得た。

共焦点レーザー顕微鏡によるウイルスタンパク質の解析
スライドガラス上に, 5%FBS 含有 MEM (Minimum essential medium, Invitrogen) で培養した細胞を PBS (100 μL/well) で洗浄後, 無血清培地 (100 μL/well) で一晩培養した。A/Memphis/1/71 (H3N2) 株 (8 HAU) の MEM (FBS 非含有) 懸濁液 (80 μL/well) を加え, 34℃, 5%CO₂ で一時間感染させた。ウイルス感染後, MDCK 細胞を PBS (100 μL/well) で洗浄し, ウイルス HA を解裂・活性化させるためにアセチルトリプシン (2 μg/ml) 含有無血清培地 (100 μL/well) を加え, 34℃, 5%CO₂ 条件下で7時間培養した。細胞を PBS (100 μL/well) で洗浄後, メタノール (80 μL/well) を加え, 室温, 30秒間固定化した。ウイルス抗体 (80 μL/well) を加え, 室温, 30分間反応させた。固定化した細胞を PBS (100 μL/well) で洗浄し, 遮光条件下 0.5% 脱脂 BSA-PBS で50倍希釈した FITC 標識抗マウス IgM 抗体 (80 μL/well) を加え, 室温, 30分間反応させた。蛍光退色防止剤を一滴下し, カバーガラスをかぶせ, 正立型共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Zeiss) で観察した。

結 果

アミノ酸を点変異させた H3 HA 遺伝子を含む組換えインフルエンザウイルスの糖鎖結合性 これまでの研究から, 1968年から1979年に分離された9株の H3N2 型ヒトインフルエンザ A ウイルス (IAV) の HA 遺伝子配列と Neu5Ac と Neu5Gc 含有合成糖脂質に対する反応性から, A/Memphis/1/71 (H3N2) 株を除く他の株は両方のシアル酸分子種に結合すること,

また A/Memphis/1/71 (H3N2) 株と他のウイルス株間では、HA の受容体結合領域近傍の 5 アミノ酸残基 (137, 144, 155, 158, 193) が異なることが判明している。そこで、Neu5Gc との結合性に関与するアミノ酸残基を明らかにするために、A/Memphis/1/71 株の HA 遺伝子を基に、これらのアミノ酸残基を 1 箇所ずつ部位特異的に点変異させた HA 遺伝子を含有する 5 種類の組換えインフルエンザウイルスを作製した。さ

らに、シアル酸分子種 (Neu5Ac, Neu5Gc) とシアル酸結合様式 (α 2,3 結合, α 2,6 結合) の異なる 4 種類の合成糖脂質を用いて、TLC/virus binding assay と solid-phase binding assay により各組換えウイルスのシアロ糖鎖結合性を解析した (Fig. 6, 7)。その結果、137 番, 144 番, 193 番を変異させた組換えウイルスは、A/Memphis/1/71 株と同様に Neu5Ac α 2,6Gal 含有糖鎖のみに結合性を示したが、155 番目を Thr から

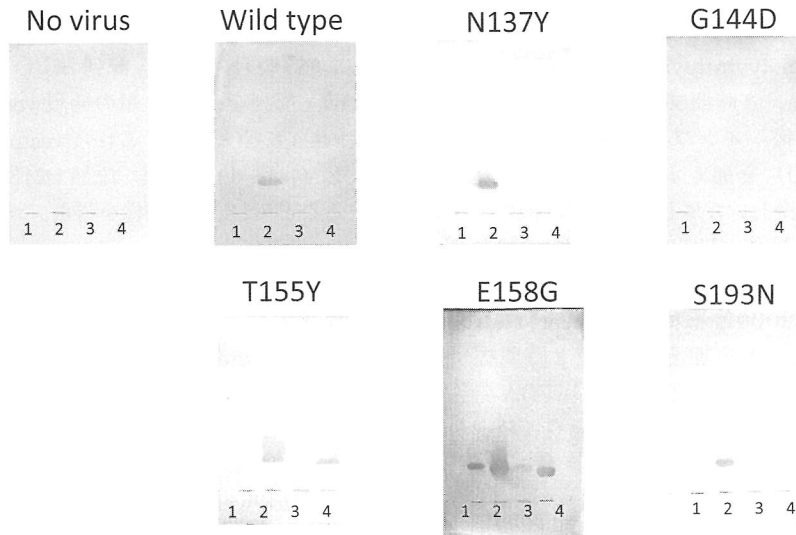


Fig. 6 Binding of reverse genetics IAVs to synthetic sialylglycolipids in virus overlay assays. Binding ability of each recombinant IAV was determined by a virus overlay assay with TLC. 1, IV^o(Neu5Ac)nLc₄B30; 2, IV^o(Neu5Ac)nLc₄B30; 3, IV^o(Neu5Gc)nLc₄B30; 4, IV^o(Neu5Gc)nLc₄B30.

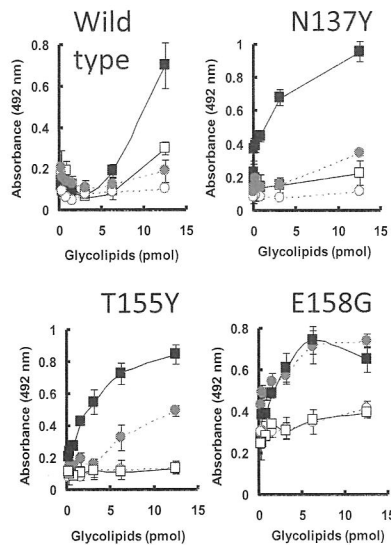


Fig. 7 Binding of reverse genetics IAVs to synthetic sialylglycolipids in solid-phase binding assays. Binding ability of each recombinant IAV was determined by a solid-phase binding assay. Sialylglycolipids: open square, IV^o(Neu5Ac)nLc₄B30; closed square, IV^o(Neu5Ac)nLc₄B30; open circle, IV^o(Neu5Gc)nLc₄B30; closed circle, IV^o(Neu5Gc)nLc₄B30.

Tyr 変異させた組換えウイルスは, Neu5Ac α 2,6Gal 含有糖鎖だけでなく Neu5Gc α 2,6Gal 含有糖鎖にも結合性を示した. また, 158 番目を Glu から Gly に変異させた組換えウイルスは, 4 種類全ての糖脂質に結合性を示すことが判明した.

シアル酸分子種認識に関与する H3 HA のアミノ酸領域 HA の結晶構造データに基づいたコンピューターシミュレーションから, これらのアミノ酸変化は, NeuGc との結合に有利に作用することが推測された (Fig. 8). これにより, HA 糖タンパク質の 155 番目と 158 番目のアミノ酸がシアル酸分子種認識機構に重要であることが判明した. 特に 158 番目の変異は, Neu5Gc への結合のみならず, より広範囲のシアル酸分子種へ結合するために重要であることが示唆された.

Sulfatide による IAV 複製の促進 Sulfatide の発現が認められないことが報告されている COS-7 細胞に CGT と CST の遺伝子を導入することで, sulfatide を恒常的に発現させた2種類の変異細胞 (SulCOS1 細胞と SulCOS2 細胞) を作製し, IAV の感染増殖性を比較した. IAV の吸着や侵入に相違は認められなかったにも関わらず, SulCOS1 細胞と SulCOS2 細胞から産生された新生ウイルス量は, COS-7 細胞と比較して数千倍に増加した (Fig. 9).

Sulfatide のノックダウンによる IAV 複製の著しい低下 MDCK 細胞に ASA の遺伝子を導入することで, 細胞膜の Sulfatide を恒常的に減少させた変異細

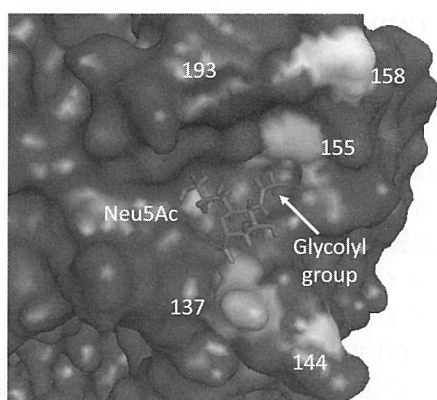


Fig. 8 The receptor-binding pocket with Neu5Gc. Location of altered residues within and neighboring the receptor-binding pocket with Neu5Ac. The arrow indicates the *N*-acetyl group of Neu5Ac. The model was generated by using PyMol Molecular Graphics System 1.1r1 (Delano Scientific LLC).

胞を作製し, IAV の増殖性を親細胞と比較した. その結果, 新生ウイルスの産生は数十分の一に減少した. さらに, CST mRNA に対する RNAi 法により CST 遺伝子をノックダウンさせることで, 新生ウイルスの産生が顕著に減少することが判明した (結果省略; Takahashi *et al.*, 2008参照).

抗 Sulfatide 抗体による IAV 複製後期の阻害 抗 Sulfatide 単クローン抗体 GS-5 を用いて MDCK 細胞における IAV の増殖阻害効果を調べた. IAV 感染前と感染時に MDCK 細胞を GS-5 で処理してもウイルスの吸着や増殖に影響は見られなかった. 一方, IAV 感染後から 4 時間以降に GS-5 で MDCK 細胞を処理すると, 新生ウイルスの産生が著しく減少することが判明した. しかしながら, IAV 感染から 2 時間後までに GS-5 で処理しても, 増殖阻害効果は認められなかった. また, MDCK 細胞を抗 Gb3Cer 単クローン抗体 (TU-1) や抗 GM3 単クローン抗体で処理しても, ウイルス増殖阻害効果は認められなかった (結果省略: Takahashi *et al.*, 2008参照).

Sulfatide による vRNP 複合体核外輸送の制御 apical ソーティングシグナルをもつ HA と NA のスパイク糖タンパク質は, 翻訳後にゴルジ装置を経由して細胞膜表面に移送される. また, IAV の核タンパク質 (NP) や 3 種類のポリメラーゼ (PB1, PB2, PA) は, 翻訳後に核内に移動し, ウイルスゲノム RNA と ウイルス核酸タンパク質 (vRNP) 複合体を形成する. この vRNP 複合体は核内から HA と NA を含む細胞膜に移送されたのち, ウイルス粒子を形成し, 細胞膜表面から出芽する (Martin *et al.*, 1991; Nayak *et al.*, 2004). そこで, RNAi 法により CST 遺伝子をノックダウンさせた MDCK 細胞を用いて, 共焦点レーザー蛍光顕微鏡を利用した免疫蛍光抗体法により, 新たに合成された HA, NA, NP の IAV 感染 26 時間後における細胞内分布を調べた. 興味深いことに, CST 遺伝子をノックダウンさせた MDCK 細胞においては正常な MDCK 細胞と異なり, NP が核内に留まり核外に移送されないことが判明した. 一方, HA と NA のスパイク糖タンパク質はいずれも細胞膜に観察され, Sulfatide をノックダウンさせた MDCK 細胞と対照細胞間で局在性に相違は認められなかった. また, Sulfatide の発現が認められない COS-7 細胞においても Sulfatide をノックダウンさせた MDCK 細胞と同様に, NP は核外に移送されなかった. 一方, Sulfatide を恒常的に発現させた SulCOS1 細胞においては, 正常な MDCK 細胞と同様に, NP の核外輸送

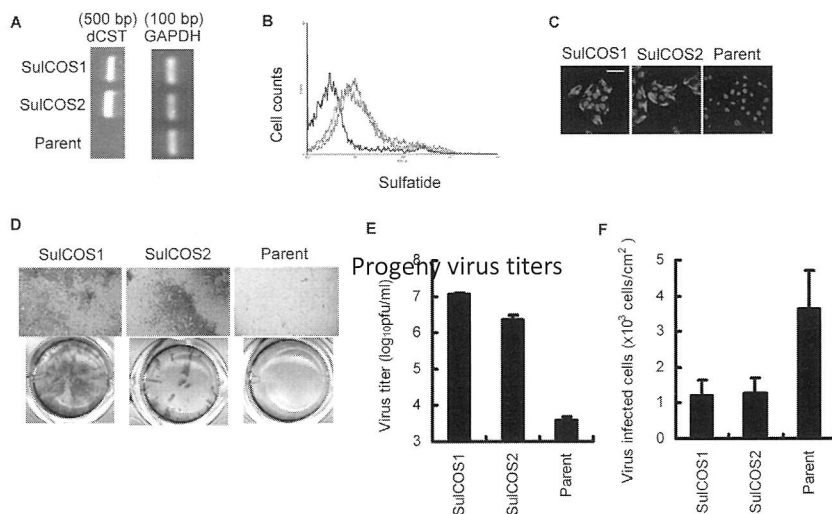


Fig. 9 Multiple replications of IAV in sulfatide-enriched COS-7 cells.

Two sulfatide-enriched cell clones were generated by transfection of COS-7 cells with both dog CST (dCST) and CGT genes and cloning. (A) Detection of dCST mRNA expression in sulfatide-enriched cell clones (SulCOS1 and SulCOS2) by RT-PCR. Glycerolaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA was used as a control. (B) Flow cytometry analysis of sulfatide contents on the surface of sulfatide-enriched cell clones (SulCOS1, red line; SulCOS2, blue line) and parent cells (black line) with anti-sulfatide MAb (GS-5). (C) Fluorescent observation of sulfatide (green) and nucleus (blue) in sulfatide-enriched cell clones and parent cells. Scale bar is 50 μ m. (D) Observation of infected cells in a well (lower) or under an optical microscope at a magnification of $\times 40$ (upper) at 24 h postinfection in the presence of acetylated trypsin to generate virus multiple replications. Cells were infected with A/WSN/33 (H1N1) at 2.5×10^2 pfu per well. (E) Virus multiple replication titers in the supernatant from infected cells of (D) were measured by a plaque assay. (F) The number of initial infection in sulfatide-enriched cells. Sulfatide-enriched cells and parent cells were infected with IAV at 1.25×10^4 pfu per well. At 15 h postinfection in the presence of zanamivir to prevent virus multiple replications, the infected cells were counted per area unit. Standard deviations were calculated from the three independent experimental data.

が観察された。さらに、MDCK 細胞や SulCOS1 細胞を抗スルファチド単クローン抗体 (GS-5) で処理すると、COS-7 細胞や Sulfatide をノックダウンさせた MDCK 細胞と同様に、NP は核外に移送されないことが判明した (Fig. 10)。

考 察

HA タンパク質の 155 番目と 158 番目のアミノ酸がシアル酸分子種認識機構に重要であることが判明した。特に 158 番目の変異は、Neu5Gc への結合のみならず、より広範囲のシアル酸分子種へ結合するために重要であることが示唆された。

また、近年分離されている H3 型ヒトインフルエンザウイルスの 155 番目のアミノ酸は Thr, 158 番目のアミノ酸は Lys であり、おそらく Neu5Gc には結合しないと思われる。今後流行するインフルエンザウイルス株の HA 遺伝子を調査することで、インフルエンザの世界的大流行を予測するための手がかりになること

が期待される。CMP-Neu5Ac hydroxylase (CMAH) 酵素が、チトクロム b5 の存在下、CMP-Neu5Ac を基質として CMP-Neu5Gc へ変換することが知られている。またヒトでは、CMAH 遺伝子に変異が生じており、N 末端 92 塩基が欠失しているため、ヒト由来細胞は Neu5Gc の合成活性を有していない。そこで、IAV の感染・伝播におけるシアル酸分子種認識の影響を明らかにするために、現在 Neu5Gc を産生するヒト由来細胞株の作製を試みている。

一方、ウイルス粒子の形成と出芽において HA と NA のスパイク糖タンパク質は、細胞膜上の lipid rafts と呼ばれている機能的マイクロドメインに移送されることが知られている。lipid rafts は、膜輸送、ウイルスの進入や出芽、細胞内情報伝達など様々な細胞現象に関与していることが知られている (Chazal & Gerlier, 2003; Schuck *et al.*, 2004)。Sulfatide は lipid rafts の構成成分であるが、ウイルス感染における役割はこれまで不明であった。本研究により、感染細胞膜表面へ移送された HA はスルファチドと結合す

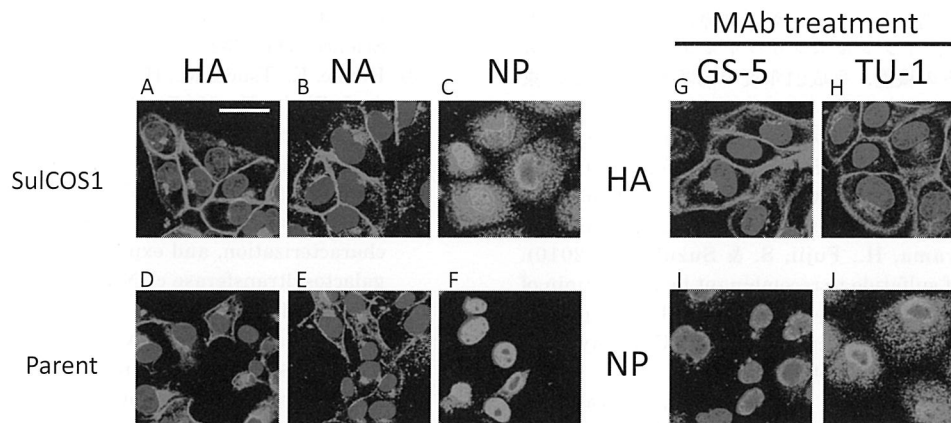


Fig. 10 Distribution of viral HA, NA, and NP in IAV-infected sulfaide-enriched COS-7 cells and in the cells treated with anti-sulfaide MAb.

SulCOS1 and parent cells were infected with IAV A/Memphis/1/71 (H3N2) at an MOI of 5 pfu per cell and maintained in a medium containing 1% FBS or containing GS-5 or TU-1 plus 1% FBS at 37 °C. At 7 h postinfection, the infected cells were fixed. The newly synthesized viral proteins, HA, NA, or NP, were stained with respective specific MAbs (red). Nuclei within the cells were stained with DAPI (blue). Scale bar is 50 μm. (A-C) Distribution of HA (A), NA (B), and NP (C) in infected SulCOS1 cells. (D-F) Distribution of HA (D), NA (E), and NP (F) in infected parent cells. (G-J) Distribution of HA (G and H) and NP (I and J) in infected SulCOS1 cells treated with GS-5 (G and I) or TU-1 (H and J).

ることによってvRNP複合体の核外輸送を誘導することが明らかとなった。HA-Sulfatide間の結合阻害剤は新たな抗ウイルス剤として期待される。

要 約

ヒトH3HA分子の155番目と158番目のアミノ酸残基がシアル酸分子種の認識に重要であること、特に158番目の変異は、広範囲のシアル酸分子種への結合性を規定していることが判明した (Takahashi *et al.*, 2009)。一方、IAV感染細胞内で新たに合成されたHAは細胞膜表面へ移行後、細胞膜のsulfatideと結合することで、ウイルス核酸タンパク質複合体の核外輸送を誘導し、新生ウイルスの粒子形成を促進していることが判明した。さらに、sulfatideとHA間の結合を阻害する抗sulfatide単クローナル抗体は、ウイルスの亜型を問わず、強力なウイルス増殖抑制効果を示した (Takahashi *et al.*, 2009)。IAV感染におけるHAと複合糖質分子の役割が解明されることで、インフルエンザ感染症の予防と治療に貢献するものと思われる。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 鈴木 隆, 高橋忠伸, 本家孝一, 小倉 潔, 田井直, 川崎一則, 左 一八, 鈴木康夫 (2008). インフルエンザウイルスの感染と糖鎖, 日本薬学会第128年

会, 横浜, p.123.

- 2) 鈴木 隆 (2008). 硫酸化糖脂質を介した新規インフルエンザウイルス複製機構と新たな抗ウイルス薬戦略, 日本薬学会第128年会, 横浜, p. 157 (招待講演).
- 3) 高橋忠伸, 橋本麻子, 丸山真美, 石田秀治, 木曾真, 河岡義裕, 左 一八, 鈴木康夫, 鈴木 隆 (2008). ヒトインフルエンザA型ウイルスH3型ヘマグルチニンのシアル酸分子種認識機構の解析, 第22回インフルエンザ研究者交流会の会, 東京, p. 7.
- 4) 高橋忠伸, 本家孝一, 小倉 潔, 田井直, 川崎一則, 左 一八, 鈴木康夫, 鈴木 隆 (2008). インフルエンザウイルスの増殖におけるSulfatideの機能, 第22回インフルエンザ研究者交流会の会, 東京, p. 7.
- 5) Suzuki, T., Guo, C.-T., Suzuki, Y. & Takahashi, T. (2008) Sulfatide is required for efficient replication of influenza A virus, The Eighth China-Japan International Symposium on Health Sciences, Hangzhou, China, p. 39-40. (invited)
- 6) 高橋忠伸, 村上宏起, 本家孝一, 小倉 潔, 田井直, 川崎一則, 左 一八, 郭 潮潭, 鈴木康夫, 鈴木隆 (2008). 硫酸化糖脂質スルファチドはインフルエンザウイルスの増殖を促進する, 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会, 神戸, p. 821.
- 7) 高橋忠伸, 鈴木 隆 (2009). ウイルス結合性アシアロ硫酸化糖脂質を介したウイルス感染機構の解明, 2008 US フォーラム, 静岡, p. 133.
- 8) 鈴木 隆 (2009). インフルエンザウイルスの感染と糖鎖, 立命館大学理工学研究所ワークショップ「糖鎖と神経研究の新展開」, 南草津, p. 1. (招待講演)
- 9) 高橋忠伸, 村上宏起, 本家孝一, 小倉 潔, 田井

- 直, 川崎一則, 左 一八, 郭 潮潭, 鈴木康夫, 鈴木隆 (2009). インフルエンザウイルス感染におけるスルファチドの機能, 平成21年度中部乳酸菌研究会, 東京都国立, p. 6.
- 10) Suzuki, T. (2010). Role of sulfatide in influenza A virus infection, The 28th Naito Conference Glycan Expression and Regulation [I], Shonan, p.45-46.
 - 11) Takahashi, T., Satoh, H., Takaguchi, M., Takafuji, S., Yokoyama, H., Fujii, S. & Suzuki, T. (2010). Binding of sulfatide to recombinant hemagglutinin of influenza A virus produced by a baculovirus protein expression system, International Carbohydrate Symposium, Tokyo, p. 478.
 - 12) Takahashi, T., Satoh, H., Takaguchi, M., Takafuji, S., Yokoyama, H., Fujii, S. & Suzuki, T. (2010). Binding of sulfatide to recombinant hemagglutinin of influenza A virus produced by a baculovirus protein expression system, 3rd International Conference on Health and Longevity Sciences, Shizuoka, p. 13.
 - 13) 鈴木 隆, 高橋忠伸 (2010) . タンパク質発現システムにより作製した H5 型 HA と sulfatide の結合性, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, p. 169.
- 原著論文
- 1) Takahashi, T., Murakami, K., Nagakura, M., Kishita, H., Watanabe, S., Honke, K., Ogura, K., Tai, T., Kawasaki, K., Miyamoto, D., Hidari, I.P.J. K., Guo, C.-T., Suzuki, Y. & Suzuki, T. (2008). Sulfatide Is Required for Efficient Replication of Influenza A Virus. *J. Virol.* **82**: 5940-5950.
 - 2) Takahashi, T., Hashimoto, A., Maruyama, M., Ishida, H., Kiso, M., Kawaoka, Y., Suzuki, Y. & Suzuki, T. (2009). Identification of amino acid residues of influenza A virus H3 HA contributing to the recognition of molecular species of sialic acid. *FEBS Lett.* **583**: 3171-3174.
 - 3) Takahashi, T., Satoh, H., Takaguchi, M., Takafuji, S., Yokoyama, H., Fujii, S. & Suzuki, T. (2010). Binding of sulfatide to recombinant hemagglutinin of influenza A virus produced by a baculovirus protein expression system. *J. Biochem.* **147**: 459-462.
- 謝 辞
- 本研究の遂行にあたり, 多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に厚くお礼申し上げます。本研究のために精力的に実験に取り組んでくれた橋本麻子さん, 村上宏起君, 長倉百江さんに感謝いたします。
- 文 献
- 1) Chazal, N. & Gerlier, D. (2003). Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 226-237.
 - 2) Enserink, M. (2006). Avian influenza. H5N1 moves into Africa, European Union, deepening global crisis. *Science*, **311** : 932.
 - 3) Honke, K., Tsuda, M., Hirahara, Y., Ishii, A., Makita, A. & Wada, Y. (1997). 1997. Molecular cloning and expression of cDNA encoding human 3'-phosphoadenylylsulfate: galactosylceramide 3'-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* **272**: 4864-4868.
 - 4) Kapitonov, D. & Yu, R.K. (1997). Cloning, characterization, and expression of human ceramide galactosyltransferase cDNA. *Biophys. Res. Commun.* **232**: 449-453.
 - 5) Martin, K. & Helenius, A. (1991). Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **67**: 117-130.
 - 6) Miyamoto, D., Ueno, T., Takashima, S., Ohta, K., Miyawaki, T., Suzuki, T. & Suzuki, Y. (1997). Establishment of a monoclonal antibody directed against Gb3Cer/CD77: a useful immunochemical reagent for a differentiation marker in Burkitt's lymphoma and germinal centre B cells. *Glycoconj. J.* **14**: 379-388.
 - 7) Nayak, D.P., Hui, E.K. & Barman, S. (2004). Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res.* **106**: 147-165.
 - 8) Neumann, G., Noda, T. & Kawaoka, Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* **459**: 931-939.
 - 9) Schuck, S. & Simons, K. (2004). Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J. Cell. Sci.* **117**: 5955-5964.
 - 10) Suzuki, T., Sometani, A., Yamazaki, Y., Horiike, G., Mizutani, Y., Masuda, H., Yamada, M., Tahara, H., Xu, G., Miyamoto, D., Oku, N., Okada, S., Kiso, M., Hasegawa, A., Ito, T., Kawaoka, Y. & Suzuki, Y. (1996). Sulphatide binds to human and animal influenza A viruses, and inhibits the viral infection. *Biochem. J.* **318**: 389-393.
 - 11) Suzuki, Y., Ito, T., Suzuki, T., Holland, R. E. Jr, Chambers, T. M., Kiso, M., Ishida, H. & Kawaoka, Y. (2000). Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J. Virol.* **74**: 11825-11831.
 - 12) Suzuki, Y. (2005). Sialobiology of influenza: Molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Bio. Pharm. Bull.* **28**: 399-408.
 - 13) Stein, C., Giesemann, V., Kreysing, J., Schmidt, B., Pohlmann, R., Waheed, A., Meyer, H.E., O'Brien, J.S. & Figura, von K. (1989). Cloning and expression of human arylsulfatase A. *J. Biol. Chem.* **264**: 1252-1259.
 - 14) Takahashi, T., Murakami, K., Nagakura, M., Kishita, H., Watanabe, S., Honke, K., Ogura, K., Tai, T., Kawasaki, K., Miyamoto, D., Hidari, I.P.J. K., Guo, C.-T., Suzuki, Y. & Suzuki, T. (2008). Sulfatide Is Required for Efficient Replication of Influenza A Virus. *J. Virol.* **82**: 5940-5950.
 - 15) Takahashi, T., Hashimoto, A., Maruyama, M.,

- Ishida, H., Kiso, M., Kawaoka, Y., Suzuki, Y. & Suzuki, T. (2009). Identification of amino acid residues of influenza A virus H3 HA contributing to the recognition of molecular species of sialic acid. *FEBS Lett.* **583**: 3171-3174.
- 16) Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M. & Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol. Rev.* **56**: 152-179.
- 17) Webster, R.G., Peiris, M., Chen, H. & Guan, Y. (2006). H5N1 outbreaks and enzootic influenza. *Emerg Infect Dis.* **12**: 3-8.

変性ポリエチレンテレフタレート分解性好熱菌由来の 分解酵素の解明と利用に関する研究

河合 富佐子

京都工芸繊維大学ナノ材料・デバイス研究センター

〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町

Polyesterases that can degrade modified polyethylene terephthalate from a thermophilic *Thermobifida alba* AHK119

Fusako Kawai

Center for Nanomaterials and Devices, Kyoto Institute of Technology,
Goshokaido-cho, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

Thermobifida alba AHK119 was isolated from compost as a potent thermophilic degrader of aliphatic-co-aromatic polyesters. A gene encoding polyesterase (*est119*) was cloned from strain AHK119, based on the conserved region of a lipase family from *Actinomycetes* and inverse PCR. The gene was successfully expressed as *Escherichia coli* Rosetta-gami B (DE3)-pQE80L-*est119*. Dot-blot hybridization and reverse transcriptional PCR indicated that the expression of *est119* was constitutive in the absence or presence of polyesters. Purified Est119 was active toward aliphatic and aliphatic-co-aromatic polyesters. Kinetic values indicated that *p*-nitrophenyl butyrate or hexanoate were the best substrates among *p*-nitrophenyl acyl esters. Ca^{2+} was requisite for the full activity and thermostability of Est119. 3D modeling and biochemical properties showed that Est119 is a typical cutinase with a compact ternary structure of α/β -hydrolase. Random mutation of wild type Est119 indicated that activity was improved by increased hydrophobic interaction between antiparallel E1 and E2 beta-sheets (A68V) stabilizing the pleated sheets of the core structure. The thermostability was increased by the introduction of proline on a predicted substrate-docking loop in the proximity of the active site (S219P). The specific activity of a mutant A68V/S219P increased to more than 50-fold compared with the wild type, and the mutant was stable up to 60°C. In the upstream region of *est119* encoding hydrolase 2, the identical gene encoding hydrolase 1 was sequenced, which are homologous to hydrolases 1 and 2 from *T. fusca*. Two genes belong to independent operons. In conclusion, *T. alba* strain AHK119 exerts high degradation ability on polyester fiber in compost through an arithmetic effect of plural polyesterases.

Key words: *Thermobifida alba* AHK119, modified PET, polyesterase, cutinase, tandem genes

緒 言

合成高分子、特にプラスチック類は20世紀を代表する発明の一つである。しかし、天然高分子を凌駕する耐久性と物性を有するプラスチックはその耐久性のため、言い換えれば生分解されないため、環境中に長期間残存して環境問題を引き起こすので、生分解性を付与することが課題となった。しかし、耐久性と物性は

相反することが多い。例えばポリエステルは基本的にグリコールとジカルボン酸をモノマーとするエステル重合物である。グリコールとしては炭素数1-4のエチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコールが主に使用される。ジカルボン酸としては脂肪酸（コハク酸、アジピン酸など）及び芳香族（ほとんどがテレフタル酸である）が使用される。脂肪酸ポリエステルは生分解性が高いが、耐熱性や強度などが低い。これに対して芳香族ポリエステル、特にその代表であるポリエチレンテレフタル酸（PET）は耐熱性と強度が優れ、繊維、容器類、フィルムなど多く

の用途が期待されるが、環境中での自然分解には50年近い年月を要すると考えられている。環境中では太陽光線や酸素による劣化と劣化したPETの微生物分解が考えられるが、いわゆる生分解性は事実上ないに等しい。この両者の特性を生かそうとした試みが脂肪族芳香族コポリエステルである。つまり、実用性に耐える物性を維持しながら、生分解性が期待できるポリエステルの合成である。ドイツでは約20年前から国家プロジェクトとして生分解性ポリエステルの実用化と生分解研究が実施されている。ドイツのグループは堆肥から得られた耐熱性放線菌 (*Thermobifida fusca*) が脂肪族芳香族コポリエステルの一種である Ecoflex® の分解能を示すことから、同菌の分解酵素を研究し、その遺伝子のクローニングに成功した (Kleeberg *et al.*, 2005; Dresler *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007)。これ以降、*T. fusca* を遺伝子源とするポリエステル分解酵素遺伝子の研究が世界的に行われている (Lykidis *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Sinsereekul *et al.*, 2010)。

ポリエステルは現代生活には不可欠の物質として石油から生産されている。しかし、「持続可能な社会」の構築には生物由来の原料から廃棄物処理にいたる循環系の構築が求められている。グリコール類及び脂肪族有機酸は発酵生産が可能であるため、脂肪族ポリエステルは全て生物由来の素材を利用するバイオプラスチックの1種と考えることができる。芳香族有機酸に関しても将来的には発酵生産可能な物質への転換や発酵生産物からの変換で生産される可能性がある。他方、ポリエステル製品廃棄物の分解処理や原料であるモノマー類のリサイクルには分解菌や分解酵素の活用が不可欠である。

PETに準ずる物性を有し、かつ生分解性が期待できるような変性PETが要求されていることを踏まえ、本研究ではこれをターゲットとして分解菌を堆肥より分離し、分解菌から分解酵素遺伝子をクローニングするとともに変異による循環系システムの構築を試みた。分解菌の活用のためには、変性PETの繊維を堆肥に埋設して、分解菌の接種による分解の促進を検証した。耐熱性酵素の分解機構の解明は変性PET繊維の堆肥処理の科学的な裏付けデータになるとともに、耐熱性酵素触媒としての今後の活用が期待できる。

実験方法

使用菌株、培養及び試薬類 本研究では堆肥より分離した菌の中から、*T. alba* AHK119 (FERM BP-10829) を選んで使用した (Hu *et al.*, 2008)。培養は Luria-Bertani broth (LB) で 50°C、2-3 日間震盪培

養を行った。分解遺伝子 (*est119*) を導入した形質転換体 (*E. coli*-pQE80L-*est119*) はアンピシリン (50 µg/ml) 及び isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加した LB で 37°C、12-16 hr 培養した。分解テストに使用したポリエステルは脂肪族ポリエステルとして poly(caprolactone) (PCL: 平均分子量 40,000), poly(butylene succinate-co-adipate) (PBSA: 平均分子量 1.0×10^5), poly(butylene succinate) (PBS: 平均分子量 1.3×10^5) を用いた。コポリエステルとしてもちいた Ecoflex® はテレフタル酸 (TPA), 1,4-butylene glycol, adipate 及び開示されていない物質を含む。Apexa®4027 は TPA, ethylene glycol 及び開示されていない成分を含む。また、poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) 及び poly(lactic acid) (PLA: 平均分子量 1.7×10^5) を使用した。

分解産物の測定 コポリエステルの分解生成物である TPA は液体クロマトグラフィー (HPLC) により測定した。測定は下記の条件で行った。液体クロマトグラフ: 東ソー CCPM-II 8020; detection: Tosoh UV-8020; columns, Tosoh TSK-GEL2500PW+TSK-GEL3000PW; eluent, 0.3M NaNO₃; flow rate, 1.0 ml/min; pressure, 1.8 Mpi; temperature, 30°C; injection volume, 50 µl. TPA に該当する吸収ピークを分取し、真空下で乾固後、クロロホルムで抽出し、マススペクトル分析 (ESI-TOF-MS) を micro-TOF instrument (Bruker Daltronics, Germany) にて行った。

分解酵素遺伝子のクローニング リパーゼの保存配列である GX SXG と *T. fusca* の codon usage からプライマーをデザインし、全 DNA を鋳型として PCR を行った (Hu *et al.*, 2010)。得られた DNA 断片は保存配列を含んでいた。そこで、全 DNA を制限酵素処理後 self-ligation して、これを鋳型に inverse PCR を繰り返して ORF を得て、これを *est119* とした。この上下流を inverse PCR により伸長した。Est119 の発現は pBR322, pET23a, pCold I 及び *E. coli* DH5a, BL21 (DE3) の組み合わせでは成功せず、*E. coli*-pQE80L-*est119* としてのみ、可溶性画分に発現した。塩基配列の解析は SolGent Co. (Daejeon, Korea) に依頼した。

全 RNA の調製, dot-blot hybridization 及び RT-PCR 全 RNA の調製には high pure RNA isolation kit (Roche Diagnostics Japan) を使用し、得られた全 RNA は DNase I (Invitrogen Co.) で処理後、使用し

た. この全 RNA の一部をナイロンメンブレン (Amersham Hybond™-N+, GE Healthcare Japan Ltd.) に滴下し, 75°C, 1 hr の加熱で固定化した. プローブとしては *est119* の増幅断片を用いた. RT-PCR は first strand cDNA synthesis kit (Roche) を用い, second strand は KOD plus DNA polymerase (TOYOBO) により増幅した. ネガティブコントロールとしては逆転写ステップを省略した反応を, また, ポジティブコントロールにはゲノム DNA を使用した.

酵素の精製及び酵素活性測定 形質転換体はアンピシリン (50 µg/ml) を含む LB を用いて, 37°C で培養し, OD₆₁₀ が 0.4-0.5 に到達した時, IPTG を 0.1 mM になるように加えて, さらに 12 hr 培養した. 遠心で集菌した菌体は 0.9% NaCl で 2 回洗浄後, 溶解液 (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl 及び 20 mM imidazole を含み, pH 7.4 に調整) に懸濁し, 超音波破碎により cell-free extract をえた. これを Ni-Sepharose 6 Fast Flow column (GE Healthcare) を用いて, 6 X his-tag に対する親和性クロマトグラフィーにより精製した. 精製酵素は 50 mM Tris buffer (pH 7.0) 中で透析を行って imidazole を除いた. 透析酵素はさらに Mono Q anion exchange column (GE Healthcare) に吸着後, 0.1-0.5 M NaCl の濃度勾配で溶出した. 活性画分を集めて SDS-PAGE で純度を確認し, 精製酵素として使用した. 酵素活性は *p*-nitrophenol butyrate (pNPB) を基質として 37°C で反応させ, 生成する *p*-nitrophenol (pNP) を定量した (Hu *et al.*, 2010). ポリエステル分解活性は, 0.1% の各種ポリエステル乳化寒天培地におけるハロー形成で判定した.

原子吸光分析 精製酵素約 1 mg に 50 mM CaCl₂ を加え 4°C, 3 hr の incubation 後, PD-10 脱塩カラム (GE Healthcare) により脱塩したものを, 日立原子吸光スペクトルメーター Z-9000 により分析した. CaCl₂ と incubate していない精製酵素についても分析した. コントロールとしては bovine serum albumin を使用した.

変異酵素の作成及びスクリーニング 変異酵素は Niu らの方法 (2006) に従って MnCl₂ 存在下の error-prone PCR で作成した. プライマーには BamHI (forward) 及び SalI (reverse) 制限サイトを含むようにデザインした. 反応液 (50 µl) は template DNA (10 µg), 1 X rTaq polymerase buffer, 2 mM MgCl₂, 2 mM dNTP mix, each primer (0.8 pmole), rTaq polymerase (Toyobo, 2.5U), 2% dimethyl sulfoxide 及

び MnCl₂ を含む. これを 100°C, 3 min 加熱後, PCR を開始した. 反応条件は 95°C, 7 min を 1 サイクル, 96°C, 30 sec を 30 サイクル, 76°C, 1 min を 1 サイクル, 75°C, 10 min を 1 サイクルとした. えられた DNA 断片を制限酵素処理した pQE80L に挿入し, *E. coli* Rosetta-gami B (DE3) を形質転換した. クローン (Clones) の活性は 0.5% tributyltin (TB), 0.001% Rhodamin B, ampicillin (50 µg/ml) 及び 1 mM IPTG を含む LB 寒天培地 (TB 寒天培地) で 37°C, 一夜培養後, 野生型酵素とハローサイズを比較した. 陽性クローンはさらに 60°C, 1 hr 培養し, ハローサイズの増大したものを耐熱性クローンとした. 選択したクローンの部位特異的変異は KOD plus mutagenesis kit (TOYOBO) を使用した.

結 果

堆肥埋設脂肪族芳香族コポリエステルフィルム付着菌から検出された分解菌 Apexa® フィルムを動物系及び植物系の堆肥に約 2-3 週間埋設し, 断片化のみられたフィルムの表面に付着した菌を単離した. これらを Apexa® フィルムに塗布して分解能を示したものより 37 株を選んで 16S rDNA 解析をした結果 (Hu *et al.*, 2010), *Bacillus* 類縁菌 (約 30%) 及び放線菌 (約 70%) と判定された. その中で最も優れた分解能を有した *Thermobifida alba* AHK119 を以下の実験に用いた.

コポリエステル分解菌 *Thermobifida alba* AHK119 によるポリマー粒子の分解とテレフタル酸の生成 AHK119 株が確かに分解能を保有していることを確認するため, Apexa®4027 粒子 (250 µm) を添加した LB で 50°C, 2 週間培養し, ポリマー粒子サイズを無接種の培養液と比較した (Hu *et al.* 2010). その結果, 粒子サイズの分布及び平均サイズがいずれも減少していた (Fig. 1A). また, ポリマーの分解に伴って生成する TPA を HPLC で測定した. 標準 TPA と同じ位置にピークの増大が確認されたので (Fig. 1B), ピーク画分を分取し, ESI-TOF-MS により TPA と判定した. これらの結果から, AHK119 株はポリエステル分解酵素を分泌していると判断した.

T. alba AHK119 由来の分解酵素遺伝子 (*est119*) のクローニングと Est119 の発現解析 ポリエステル分解酵素はリパーゼファミリーの一員である可能性が極めて高い. そこで, 放線菌由来のリパーゼの保存配列と *T. fusca* YX (www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin)

/showcodon.cgi?species = 269800) の codon usage に基づいてデザインしたプライマーを用いて PCR を行った。その結果、保存配列 (GX SXG) を含む 191 bp の増幅産物が得られたので、inverse PCR により全ゲノムから ORF を含む 1.5 kb の DNA 断片をえて、pGEM-T easy vector (Promega) に挿入し、*E. coli* JM109 を形質転換し、コロニーの青-白選択を行った。転換体のプラスミドを抽出し、塩基配列を確認後、GENETYX version 8.2.1 で相同酵素遺伝子とのアッセンブリーを行った。酵素の構造解析のため *Streptomyces exfoliatus* 由来のリパーゼ (1jfr) (Wei *et al.*, 1988) の結晶構造を鋳型として、ViewerLite 5.0

により 3D モデリングを行った (Fig. 2)。最終的に 903 bp の DNA 断片からシグナルペプチド相当部分を除く成熟タンパクに相当する 798 bp を pQE80L の BamHI 及び SalI サイトに挿入し、*E. coli* Roseta-gami B (DE3) を形質転換した。転換体の cell-free extract を実験方法で述べたように調製し、これを Ni-Sepharose 6 Fast Flow column に吸着させ、イミダゾール濃度を上げて溶出した。活性画分は透析でイミダゾールを除いた後、MonoQ anion exchange column に吸着させ、NaCl の濃度勾配 (0.1-0.5 M) で溶出した。活性画分は SDS-PAGE で単一タンパクであることを確認した。また、Superdex 200 column でゲル濾過を行って、分子量約 30 KDa の単量体タンパクであることを確認した。この分子量は塩基配列の結果と一致した。精製酵素は至適 pH が約 6.0、至適温度 50°C であった。また、幅広い pH (6.0-9.0) に対して安定であったが、40°C 以上で活性が減少した。リパーゼファミリー酵素の共通基質である pNP acyl esters に対する活性は pNP-C₄ (butyrate) を最適基質とし、C₆ にもほぼ同程度の活性を示したが、C₂ 及び C₈ に対する活性は著しく低下した (Table 1)。ポリエステルとしては PBSA, PSA, PCL, Ecoflex® に対して活性を示したが、PHB 及び PLA に対しては活性を示さなかった。Apexa® は適当な溶媒がないためハロー形成では活性を確認できなかった。しかし、ポリエステル構成モノマーの内、2 mM の有機酸 (TPA, アジピン酸, こはく酸) は全く影響しなかったが、2 mM のエチレングリコール及びブチレングリコールは拮抗阻害を示したので、本酵素は Ecoflex® 及び Apexa® に対する

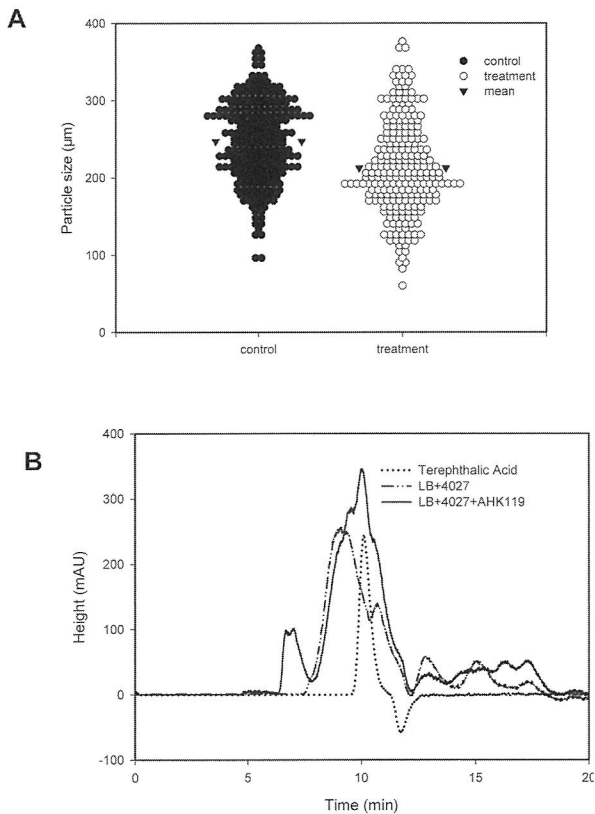


Fig. 1 Degradation of polymer particle (A) and HPLC chromatogram of degradation products in the culture supernatant (B). AHK 119 was cultivated in LB containing Apexa® 4027 particles. (A) Particle sizes are shown as an average value of the width and length of each particle. Filled circles, control; open circles, cultivated with AHK119; filled triangles, mean. (B) Dotted line, authentic TPA; bold line, supernatant of LB medium supplemented with 0.2% Apexa® 4027 particles and inoculated with AHK119; dashed line, supernatant of LB medium supplemented with the polymer particles but uninoculated.

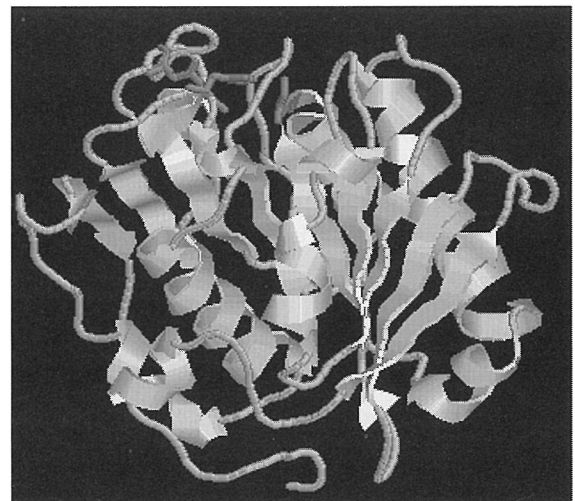


Fig. 2 The predicted 3D structure of Est119. The amino acid residues in a catalytic triad are shown in red in a ribbon diagram.

分解酵素であることが間接的に示された。3D モデリング及び酵素の諸性質は本酵素が典型的な cutinase type の酵素であることを示す。Est119 は EDTA で活性が阻害され、2 価イオン (Ca, Mg, Mn) で活性化された。特に Ca 濃度の増加とともに活性と耐熱性が増大した (Fig. 3)。E. coli の細胞内で発現した Est119 は Ca を含んでいないが、Est119 を 50 mM の CaCl₂ と incubate して Ca を結合させた後 PD-10 で脱塩すると、タンパク画分よりモル比で約 1:1 の Ca が存在したので、恐らくは活性中心に結合して cofactor として働くかと推定した。高濃度の Ca はタンパク表面に緩く結合してタンパク構造を強化し、活性と耐熱性を高めていると推測された。150 mM の Ca 存在下で Est119 は 50°C、16 hr 後も活性をほぼ 100% 維持していた。

Est119 変異酵素の作成 さらに活性と耐熱性を高めるためランダム変異を試み、約 9,000 クローンをえた。TB 寒天培地のハローから 1 次スクリーニングで 111 クローンを選択した。さらに 2 次スクリーニングで、最終的に 11 クローンを選択し、塩基配列を解析した (Fig. 4)。その内 2 クローンは耐熱性を示した。Fig. 4 に示すように、全ての変異は親水性アミノ酸の疎水性アミノ酸への置換であった。活性クローンの変異箇所は E1 strand 近辺に集中していた。また、耐熱性 2 クローンはいずれも S219P を含んでいた。これらの cell-free extracts を調製して、活性を比較した結果、A68V の活性が最も高く、S219P 単独変異の方が高い耐熱性を示した。Ala68 を疎水性アミノ酸 (I, V, L) に置換した変異酵素を比較した結果、A68V の活性が最も高く、芳香族アミノ酸 (Y, W, P) の置換では活性は増加しなかった。Ser219 を同様に疎水性アミノ酸や芳香族アミノ酸に置換して比較した結果、S219P のみが耐熱性を示した。これらの結果から結局はランダム変異でえたクローンがベストであったので、A69V/S219P の 2 重変異酵素を作成した結果、野生型酵素 (WT) と比較して活性は約 50 倍に増加した (Fig. 5)。Cell-free extracts を 50°C で 30 min また

は 60 min 温度処理して残存活性バンドを SDS-PAGE で調べた結果、S219P 及び A68V/S219P は活性バンドが残存していたが、WT 及び A68V では活性バンドは消失していた。A68V/S219P は Ca 存在下の WT と比較しても高い耐熱性を示した。

Thermobifida 属における普遍的なタンデム遺伝子の存在 Est119 の上流域を増幅した結果、約 600 bp 上流に 93% の相同性を示す遺伝子の存在が見出された。これらを既知の配列と比較検索した結果、Thermobifida 由来の相同配列がえられたので、これらから系統樹を作成した (Fig. 6)。この結果、est119 は hydrolase 2 グループにより近く、もう一つの相同遺伝子は hydrolase 1 グループに近いので、hydrolase 1 とした。T. alba については hydrolase 1 に相同な遺伝子の存在が知られているが (HQ147784.1)、同菌におけるタンデムな遺伝子の報告はない。T. cellulolytica にも同様なタンデム遺伝子の存在が報告されていることから、Thermobifida 属に普遍的に存在すると推定される。

T. alba AHK119 に置ける hydrolase 1 及び est119 オペロン 2 つのタンデム遺伝子及びそれらの周辺配列を解析した結果、hydrolase 1 は est119 (hydrolase 2) の上流に位置し、それぞれの遺伝子末端には inverted repeat 配列が存在する。また、intergenic region にはリボゾーム結合配列が存在したので、両遺伝子は別のオペロンに存在すると推定された。遺伝子の誘導性を調べるため、LB 及びポリマー添加 LB で

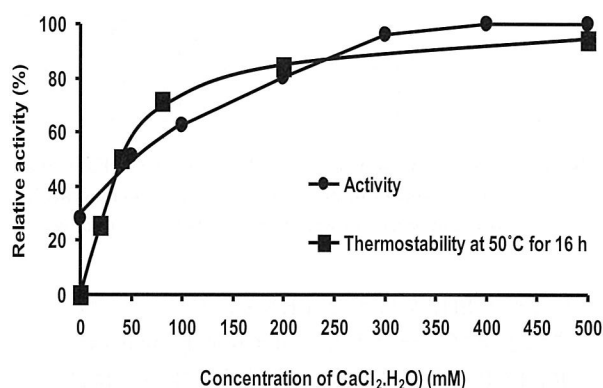


Fig. 3 Effect of CaCl₂ concentration on activity and thermostability of Est119. The pNPB hydrolase activity of Est119 was measured in the absence and the presence of various concentrations of CaCl₂. The thermostability of Est119 was confirmed after incubation at 50°C for 16 h in the absence and the presence of various concentrations of CaCl₂.

Table 1 Kinetic parameters of Est119 with different chain lengths of p-nitrophenyl esters

Substrate	V _{max} (μmol/min/mg)	K _m (mM)	k _{cat} (S ⁻¹)	k _{cat} /K _m
PNP-C2	3.97	3.22	2.06	0.64
PNP-C4	8.64	3.41	4.48	1.31
PNP-C6	6.33	2.37	3.28	1.38
PNP-C8	4.73	1.87	2.45	1.31

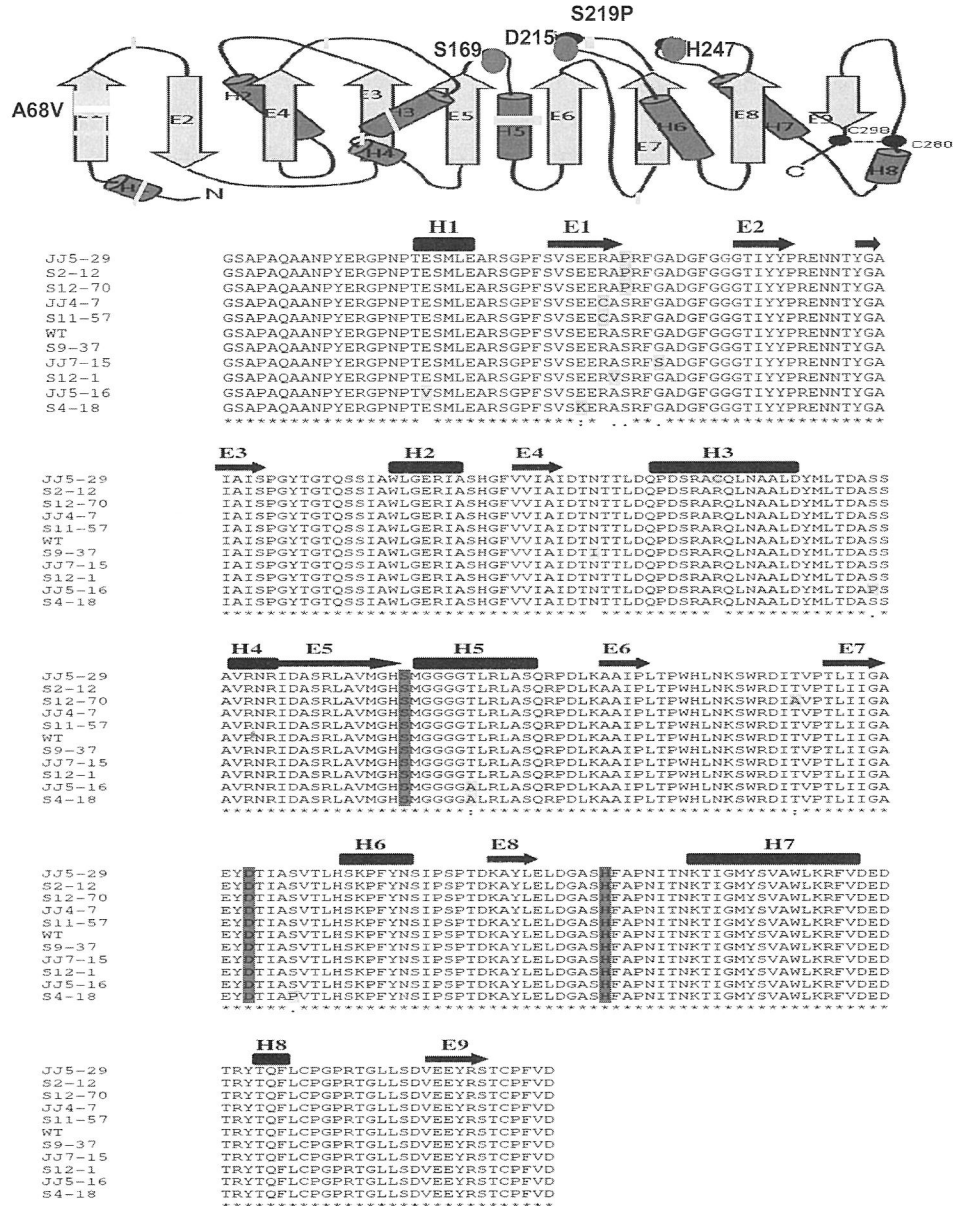


Fig. 4 Topology of the predicted 3D structure of Est119 and alignment of the amino acid sequences of WT and mutant Est119 that showed enhanced activity and thermostability. The catalytic triad (S¹⁶⁹, D²¹⁵ and H⁴²⁷) is shown in red. Points of mutation were shown in green. A68V in topology is shown in yellow.

生育させた菌体からえた mRNA に対して、それぞれの遺伝子をプローブとして dot-blot hybridization 及び RT-PCR を行った結果、構成的な発現が確認された。また、intergenic region の発現は認められなかったため、両遺伝子は同じオペロンとして発現していないことを確認した。 *T. fusca* の遺伝子は誘導的に発現すると報告されている。また、 *T. fusca* では 2 つの遺伝子はオペロンを構成するとされているが (Dresler *et al.*, 2006; Sinsereekul *et al.*, 2010), 根拠は不明で

ある。本報告は *T. alba* のタンデム遺伝子のオペロン構造と発現を初めて明らかにしたものである。

T. alba AHK119 接種によるコポリエステル繊維の堆肥分解 Apexa®4027 繊維 (編地) に AHK119 の菌体を塗布して堆肥中 (平均温度約 50℃) に埋設して、経時的に変化をみた。無接種のものでは、7 ヶ月後も形状の変化は認められなかったが、接種した場合は 3 ヶ月で明らかに形状が大きく崩れていた (Fig. 7)。

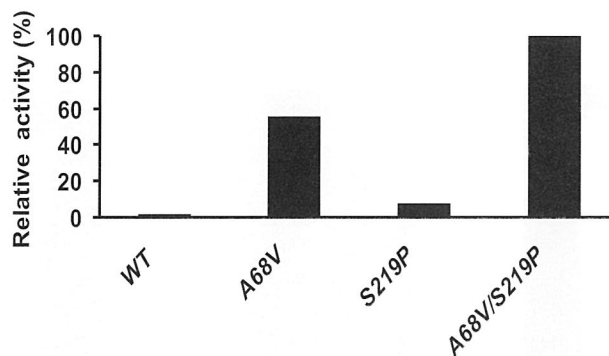
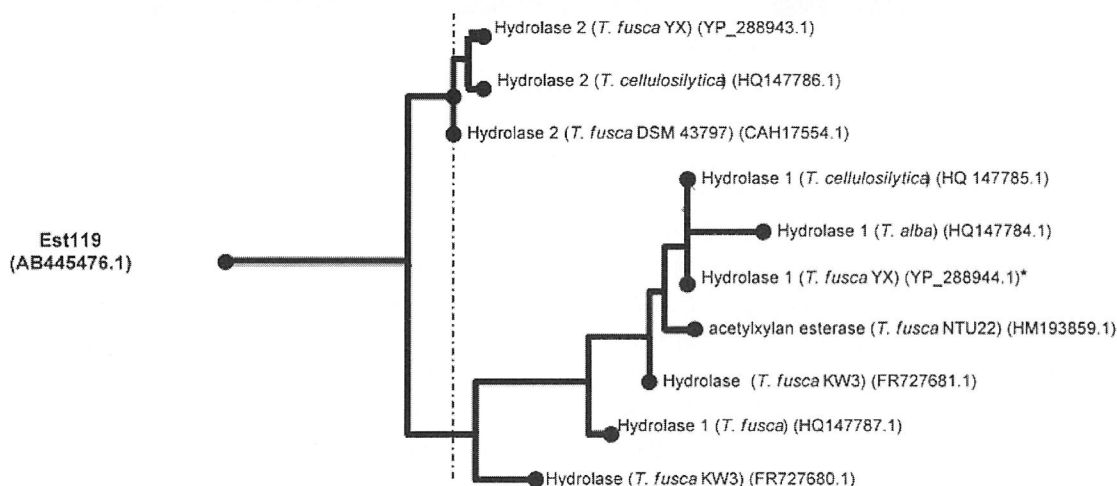


Fig. 5 Comparison of activities of purified WT and mutant Est119. Maximum activity is shown as 100%.



* = Hydrolase 1 (*T. fusca* DSM 43797) (CAH17553.1) and Hydrolase 1 (*Thermobifida* sp. BCC23166) (Sinsereekul et al., 2010)

Fig. 6 Phylogenetic relationship of Est119 with hydrolases from *Thermobifida* species.

PET 繊維では、菌の有無に関わらず、形状変化は全くなかった。

考 察

T. fusca, *T. alba* 及び *T. cellulolytica* で同じ順序で hydrolase 1 と 2 をコードする遺伝子が同じ順序でタンデムに存在することはこれらの遺伝子がセットとして分布したことが推測される。これらの遺伝子の相同性は種を超えて 90% 以上であり、かつ hydrolase 1 と 2 の間でも 90% 以上の相同性を示すことから、始現遺伝子が同じゲノム内で重複コピーされ、1 セットとして他の種に伝搬したことを推測させるものである。しかしながら、それぞれの遺伝子はこれまで確たる根拠もなく、恐らくはタンデムに並んでいるという理由で同じオペロンとされていたが、別のオペロン (単一遺伝子) であることを明らかにした。また、酵素はポ

リエステルにより誘導的に発現すると報告されているが、*T. alba* では構成的な発現であると確認された。1 セットの遺伝子の伝搬過程でプロモーター領域が変異したということも考えられるが、同時に 2 つのプロモーターが変異すると考えるよりも遺伝子誘導に関わる何らかのファクターが *T. alba* では働いていないため、2 つの遺伝子ともに構成的に発現したと考える方が妥当と考えられる。2 つの遺伝子はポリエステル分解酵素として相加的に AHK119 の分解能を高めると考えられる。

Est119 は pNP acyl esters に対する速度定数や 3D モデル構造などから、典型的な cutinase type の depolymerase と結論づけられる。酵素活性は有機酸で阻害されなかったが、Apexa® 及び Ecoflx® の成分であるエチレングリコール及びプチエングリコールでそれぞれ競争的に阻害された。ポリマーの分解実験とも合わせて、Ecoflx® や Apexa® のようなコポリエス

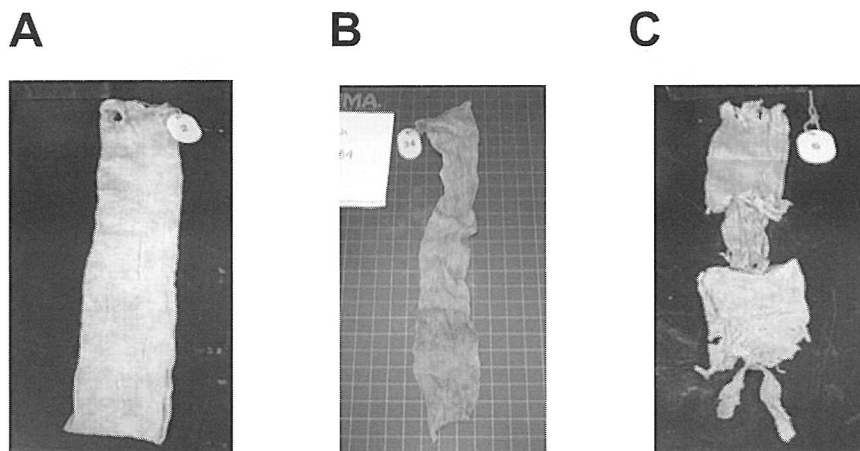


Fig. 7 Degradation of polyester fiber in compost.
A, before burial test; B, without inoculum; C, with inoculum of strain AHK119.

テル分解酵素であると結論づけられる。後者は前者に比べてはるかに融点が高く、高い融点は高分子鎖の可動性をはるかに低いことを意味し、酵素分解をはるかに困難である。温度を上げると、分子鎖の稼働性が増加するので、分解には耐熱性酵素が必要である。Est119はEDTAで反応が阻害され、また2価イオン(Ca, Mg, Mn)で活性が促進されるのは *Thermobifida cutinase* では初めての報告である。活性、耐熱性ともにCa濃度の増加とともに増大したが、両者は相互に関連していると考えられる。精製Est119をCaと混ぜて一夜放置後、PD-10カラムで脱塩し、タンパク画分を原子吸光分析するとタンパク質と等モルのCaが検出された。このことはCaがタンパク質に強固に結合していることを推定させるので、活性中心に補欠分子族として存在すると考えられる。高濃度のCaはタンパク表面に何らかの形で弱く結合して(高濃度を要求することは結合が弱いことを示す)熱変性からタンパク質を保護すると同時に活性を安定化していると推定される。この種の酵素の活性促進と耐熱性に関する報告は皆無であるので、ランダム変異で変異酵素を作成した。約9,000のクローンから最終的に11クローンを選んで塩基配列を解析した結果、全ての変異酵素は親水性アミノ酸から疎水性アミノ酸への置換を示したので、疎水性の強化がこの種の酵素にとっては重要と考えられる。特にE1 strandとその直後のアミノ酸を疎水性アミノ酸に置換すると周辺配列のhydrophathyが増加し、antiparallelに存在するE2 strandとの相互作用が強くなり、タンパク質のコア構造が強固になると推定された。疎水性アミノ酸中ではA68Vが最も高い活性を示したので、結果的にはランダム変異がベストであった。他方、耐熱性を増加した2クローンは

S219PとE65K/T175A/S219Pであったが、S219Pの方が耐熱性に優れていたため、S219Pが耐熱化要因と結論づけられた。この部位についても芳香族アミノ酸、疎水性アミノ酸への置換体を位置特異的変異で作成したが、結果的にはPに置換した時だけに耐熱化が認められた。これに関しては構造の剛直なプロリンの導入は導入部位の構造を強固にし、耐熱性を増加させたことが報告されている(Tian *et al.*, 2010; Vieille & Zeikus, 2001)。特にsurface loops, β -turns, N-cap of α -helixesへの導入は有効とされている(Sakaguchi *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 2010)。S219Pはsurface loopへの導入に該当する。 α/β -hydrolasesに対するプロリン導入による耐熱性増加は報告されていない。コア構造の疎水性相互作用の強化と表面ループ(特に活性中心周辺)へのプロリンの導入は α/β -hydrolasesの変異手段として有効な一般則になるかもしれない。

ポリエステル廃棄物の分解処理への応用性を確認するため、変性PET繊維にAHK119を塗布して堆肥に埋設した結果、無接種のものと比較して分解促進効果が認められた。さらに酵素の耐熱性及び反応性を高めることは実用化のために必要であるが、同時に酵素はどの程度まで剛直なポリエステルを分解できるか、そのために変異酵素をいかに作成するかが表面下では熾烈な競争になっている。*T. alba* AHK119はその有力な候補であると考えられる。

要 約

堆肥中の耐熱性分解菌は放線菌(約70%)と *Bacillus* 類縁菌(約30%)に大別された。*T. fusca* 由

来の分解酵素は報告されているが、*T. alba* に関する報告は全くなかった。本研究では *T. alba* の遺伝子を解明するとともに、*Thermobifida* ではそれぞれ 90% 以上の相同性を有する cutinase type の酵素遺伝子がタンデムに hydrolase 1 及び 2 の順に並んで存在することを明らかにした。このことは始源遺伝子が重複コピーされ、セットになって広く *Thermobifida* に分布したことを示す。これまでタンデムな並びなどから 2 つの遺伝子はオペロンを形成するとされていたが、塩基配列と RT-PCR により、別のオペロンであることを明らかにした。Est119 は Ca を要求する金属酵素であり、Ca の存在下で耐熱性であることを明らかにした。また、ランダム変異と部位特異的変異の結果を 3D ホモロジーモデル構造から考察し、E1 strand への疎水性アミノ酸の導入が活性を高め、活性中心を囲むループ上の S219P 変異が耐熱性には重要であることを明らかにした。この結果からコア構造の beta-sheets 間の疎水性相互作用を強めることはタンパク構造を強固にし、ループへのプロリンの導入はループ構造を安定化して耐熱性を高めていると結論づけた。最終的に得られた A68V/S219P 変異酵素は 60℃ までの耐熱性を示した。AHK119 では 2 つの耐熱性クチナーゼが相加的に分解能を発揮していると推測した。他方、AHK119 株を接種したポリエステル繊維は堆肥中で（平均温度 50℃ 以上）で顕著な分解促進効果を示した。

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) Thumarat, U., Hu, X., Nakamura, R., Suzuki, H., Ohara, H. & Kawai, F. (2009). Characterization of thermostable polyester-degrading enzyme from *Thermobifida alba* AHK119, APBioChEC'09 (Kobe, Japan).
- 2) Thumarat, U., Ohara, H. & Kawai, F. (2010). Biochemical analysis of a polyester depolymerase from a moderate thermophile *Thermobifida alba* AHK119 (Aural), International Conference on Biotechnology for Healthy Living (Trang, Thailand).
- 3) Thumarat, U., Suzuki, H. & Kawai, F. (2010). Improvement on activity and thermostability of a polyester depolymerase from a moderate thermophile *Thermobifida alba* AHK119 (Poster), International Conference on Biotechnology for Healthy Living (Trang, Thailand).
- 4) 中村遼太, Thumarat, U., 鈴木秀之, 河合富佐子 (2011). 耐熱性放線菌 *Thermobifida alba* AHK119 由来のポリエステラーゼの発現解析, 日本農芸化学会大会 (京都).
- 5) Kawai, F. (2011). Unique bacterial polyesterases. 4th

World Congress of Industrial Biotechnology-2011, (Dalian, China).

原著論文

- 1) Hu, X., Osaki, S., Hayashi, M., Kaku, M., Katuen, S., Kobayashi, H. & Kawai, F. (2008). Degradation of a terephthalate-containing polyester by thermophilic actinomycetes and *Bacillus* species derived from composts, *J. Polym. Environ.* **16**: 103-108.
- 2) Hu, X., Thumarat, U., Zhang, X., Tang, M. & Kawai, F. (2010). Diversity of polyester-degrading bacteria in compost and molecular analysis of a thermoactive esterase from *Thermobifida alba* AHK119, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**: 771-779.
- 3) Thumarat, U., Nakamura, R., Kawabata, T., Suzuki, H., & Kawai, F. Biochemical and genetic analysis of a cutinase-type depolymerase from a thermophilic *Thermobifida alba* AHK119, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* accepted.

特許

特許第 4625900 号 (2010/11/19) 「好熱性ポリエステル分解菌」

保存機関に寄託した菌株

本研究で使用した菌株は上記特許に関するもので、FERM BP-10829 として産業総合技術研究所 (AIST) の国際特許生物寄託機関 (IPOD) に寄託されている。また、関連菌株として FERM BP-10828, 10827M 及び FERM P-21507 が寄託されている。

謝 辞

本研究に対し、3年間多大なる助成を賜りました公益財団法人発酵研究所に厚くお礼申し上げます。終始、研究に協力して頂いた西北農林科技大学胡小平博士に感謝いたします。本研究は京都工芸繊維大学大学院生 Ms. Uschara Thumarat 及び中村遼太さんの学位論文、修士論文研究として行われました。また、酵素の 3D モデリングに関しては奈良先端大学院大学川端猛准教授（現大阪大学タンパク研究所）に、原子吸光分析については岡山大学資源生物科学研究所山本洋子教授にお礼申し上げます。Est119 の結晶の X 線解析に最近成功したが、これに関しては京都工芸繊維大学大学院北所健悟准教授に感謝します。堆肥の埋設分解実験に関しては岡山県農林水産総合センター畜産研究所の高取健吾氏に深謝します。

文 献

- Chen, S., Tong, X., Woodard, R.W., Du, G., Wu, J. & Chen, J. (2008). Identification and characterization of bacterial cutinase. *J. Biol. Chem.* **283**: 25854-25862.
- Dresler, K., Heuvel, J., Müller, R. J. & Deckwer, W. D. (2006). Production of a recombinant polyester-cleaving hydrolase from *Thermobifida fusca* in *Escherichia coli*. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **29**: 169-183.
- Hu, X., Osaki, S., Hayashi, M., Kaku, M., Katuen, S., Kobayashi, H. & Kawai, F. (2008). Degradation of a terephthalate-containing polyester by thermophilic actinomycetes and *Bacillus* species derived from composts. *J. Polym. Environ.* **16**: 103-108.
- Hu, X., Thumarat, U., Zhang, X., Tang, M. & Kawai, F. (2010). Diversity of polyester-degrading bacteria in compost and molecular analysis of a thermoactive esterase from *Thermobifida alba* AHK119. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**: 771-779.
- Kleeberg, I., Welzel, K., VandenHeuvel, J., Müller, R.J. & Deckwer, W. D. (2005). Characterization of a new extracellular hydrolase from *Thermobifida fusca* degrading aliphatic-aromatic copolyesters. *Biomacromolecules* **6**: 262-270.
- Lykidis, A., Mavromatis, K., Ivanova, I., Anderson, I., Land, M., DiBartolo, G., Martinez, M., Lapidus, A., Lucas, S., Copeland, A., Richardson, P., Wilson, D.B. & Kyrpides, N. (2007). Genome sequence and analysis of the soil cellulolytic actinomycete *Thermobifida fusca* YX. *J. Bacteriol.* **189**: 2477-2486.
- Niu, W. N., Li, Z. P., Zhang, D. W., Yu, M. R. & Tan, T.W. (2006). Improved thermostability and the optimum temperature of *Rhizopus arrhizus* lipase by directed evolution. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **43**: 33-39.
- Sakaguchi, M., Matsuzaki, M., Niimiya, K., Seino, J., Sugahara, Y. & Kawakita, M. (2007). Role of Proline Residues in Conferring Thermostability on Aqualysin I. *J. Biochem.* **141**: 213-220.
- Sinsereekul, N., Wangkam, T., Thamchaipenet, A., Srihirin, T., Eurwilaichitr, L. & Champreda, V. (2010). Recombinant expression of BTA hydrolase in *Streptomyces rimosus* and catalytic analysis on polyesters by surface plasmon resonance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**: 1775-1784.
- Suzuki, Y., Hatagaki, K. & Oda, H. (1991). A hyperthermostable pullulanase produced by an extreme thermophile, *Bacillus flavocaldarius* KP 1228, and evidence for the proline theory of increasing protein thermostability. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 707-714.
- Tian, J., Wang, P., Gao, S., Chu, X., Wu, N. & Fan, Y. (2010). Enhanced thermostability of methyl parathion hydrolase from *Ochrobactrum* sp. M231 by rational engineering of a glycine to proline mutation. *FEBS J.* **277**: 4901-4908.
- Vieille, C. & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 1-43.
- Wei, Y., Swenson, L., Castro, C., Derewenda, U., Minor, W., Arai, H., Aoki, J., Inoue, K., Servin-Gonzalez, L. & Derewenda, Z.S. (1988). Structure of a microbial homologue of mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases: *Streptomyces exfoliatus* lipase at 1.9 Å resolution. *Structure* **6**: 511-519.
- Yang, Y., Malten, M., Grote, A., Jahn, D. & Deckwer, W.-D. (2007). Codon optimized *Thermobifida fusca* hydrolase secreted by *Bacillus megaterium*. *Biotechnol. Bioeng.* **96**: 780-794.
- Zhou, C., Xue, Y. & Ma, Y. (2010). Enhancing the thermostability of α -glucosidase from *Thermoanaerobacter tengcongensis* MB4 by single proline substitution. *J. Biosci. Bioeng.* **110**: 12-17.

バイオマスに由来する新規ナノ・ハイブリッドファイバーに 対する微生物分解過程の解明

下 坂 誠

信州大学繊維学部応用生物学系生物機能科学課程

〒386-8567 長野県上田市常田3-15-1

Microbial degradation process for novel nano- and hybrid-fiber derived from biomass

Makoto Shimosaka

Bioscience and Biotechnology Course, Division of Applied Biology,
Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University
3-15-1 Tokida, Ueda-shi, Nagano 386-8567, Japan

Nano-sized whiskers prepared from cellulose and chitin were used as a carbon source in enrichment culture to analyze constituent species in a constructed microbial community. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) targeting the 16S rDNAs using total DNAs prepared from the community revealed that band patterns were significantly different between nano-sized whiskers and crystalline particles for both cellulose and chitin. Nano-sized whiskers are likely to be a promising material for isolating novel microbial species capable of degrading cellulose and chitin. PCR-DGGE analysis also revealed that bacterial cells adsorbed on the surface of flakes of chitin placed in a river, a moat, or soil differed extensively among the three environments. Most of the bacteria are likely to be unidentified species, which might be unculturable as judged from low similarities (less than 98.0%) when their 16S rDNA sequences were compared with those of known bacterial species. A bacterial strain capable of degrading chitin was isolated from the surface of flakes of chitin placed in moat water. The strain SAY3 was gram-negative, curved rod-shaped, facultatively anaerobic, and motile with a single polar flagellum. Since the strain was clearly distinct from closely related genera belonging to the family *Neisseriaceae* in phenotypic and chemotaxonomic characteristics, the name *Chitiniphilus shinanonensis* gen. nov., sp. nov. has been proposed. To elucidate a chitinolytic system of the strain SAY3, fifteen genes (*chiA-chiO*) coding for putative chitin-degrading enzymes were isolated from the genomic library. Sequence analysis revealed that they are composed of twelve family 18 chitinases, one family 19 chitinase, one family 20 β -*N*-acetylglucosaminidase, and one polypeptide with a chitin-binding domain but devoid of a catalytic domain. A colloidal suspension composed of nano-sized whiskers of chitin, plasmid pUC18 DNA, and cells of *Escherichia coli* was treated physically by sliding a polystyrene streak bar over the LB agar medium containing ampicillin. The antibiotic-resistant colonies appeared by the acquisition of plasmid DNA by *E. coli* cells. Under optimum conditions, the transformation frequency reached 2.1×10^6 colonies/ μ g of pUC18 DNA.

Key words: cellulose, chitin, nano-sized whisker, *Chitiniphilus*, genetic transformation

E-mail: mashimo@shinshu-u.ac.jp

共同研究者：田口悟朗（信州大学繊維学部），野川優洋（信州大学繊維学部），荒木 潤（信州大学ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点），大槻隆司（山梨大学工学部），吉田ナオト（宮崎大学農学部），横田 明（東京大学分子細胞生物学研究所）

緒 言

我々は、種々の天然繊維から衣類をはじめとする様々な繊維製品を産み出し、私たちの暮らしを豊かにしてきた。また、高分子化学の発展により種々の化学合成繊維が産み出され、繊維製品の多様化、機能化が

もたらされた。これら天然および合成繊維の直径は細いもので $10\mu\text{m}$ 程度である。現在、さらなる極細の繊維を求めて開発された電界紡糸法 (electrospinning) によって、ポリエステルやポリウレタンなどの合成高分子からナノファイバーの作出が可能となっている。ナノファイバーの直径は 100nm のオーダーであり、従来の繊維に比べて単位重量あたりの表面積は著しく増大する。その結果、軽量高強度であることに加えて、吸着性、保持性、フィルター効果の増大といったナノサイズ効果が現れるため、幅広い産業分野の基盤技術として注目を集めている (本宮・谷岡, 2003; 山下, 2007)。

ナノファイバーは、セルロースやキチンなどの天然多糖からも作出可能である。セルロースおよびキチンナノファイバーは、1) 再生可能なバイオマス由来であること、2) 高強度かつ低熱膨張性であること、3) シルクタンパク質などのような他の素材とハイブリッド化させて新たな機能を持たせることができること、4) 生分解性であること、を特徴として挙げることができる。特に、生分解性については、将来ナノファイバーが製品化された場合に考慮すべき問題であると言える。細菌細胞の径が $1\text{--}2\mu\text{m}$ であるのに対して、従来の繊維の直径は $10\mu\text{m}$ 、ナノファイバーの直径は 100nm のオーダーであり、細菌細胞との相対的なサイズの関係は両者の間で逆転する。従来、セルロースやキチンの結晶性微粉末 (直径 $20\text{--}50\mu\text{m}$) を用いて多様な分解細菌がスクリーニングされ、分解酵素やその遺伝子について多くの情報が蓄積されてきた。これらの分解細菌は、ナノサイズ化されたセルロースやキチンに対して結晶性微粉末と同じような分解挙動を示すのであろうか。これら細菌がナノサイズ化された基質を認識した場合、異なる分解酵素を誘導するなど質的な違いが生じるのか、あるいは酵素生産速度や生産量など単に量的な違いが生じるのみであらうか。これらの知見は、将来、ナノ素材からつくられた製品が自然界に放出された際の生分解性の程度や、製品として機能を発揮できる耐久性を評価するためにも重要である。本研究のひとつの目的は、この問題へのアプローチとして、ナノサイズ化されたセルロースおよびキチンに対する微生物の分解挙動を調査することにある。

本研究では、ナノサイズ効果がより顕著に現れるナノ結晶セルロースおよびキチンを実験材料として用いた (Fig. 1)。ナノ結晶は nano-sized whisker と呼ばれ、セルロース、キチンを強酸で部分的に加水分解することによって得られる針状の微細結晶である。ナノ結晶の径は 10nm 程であり、ほぼマイクロフィブリル (microfibril) の太さに相当する。また、長さは

200nm 程度であり、結晶中に一定の割合で存在する非晶質領域で加水分解を受けたものと想定される。

本研究では、ナノ結晶セルロースおよびキチンを炭素源として、各種環境由来の微生物を接種源とした集積培養を行い、形成される分解細菌群を詳細に解析し通常の結晶性微粉末を用いた場合との差異を比較した。その結果、ナノ結晶に特有な新規分解細菌が集積されることについて報告する。また、自然環境中で実際にキチンの分解利用にはたらく細菌群には未同定の難培養性細菌が多いことを示すとともに、この中から分離に成功した新属の強力なキチン分解細菌種について紹介する。最後に、ナノ結晶キチンが細菌細胞に及ぼす穿刺効果を利用し、大腸菌に対する簡便な形質転換法を開発したので併せて報告する。

実験方法

セルロースおよびキチンの調製 微小化セルロースは、結晶セルロース粉末 (メルク社製, メジアン径 $35\mu\text{m}$) 懸濁液をジェット水流下で衝突させ破砕する微細化装置スターバースト (スギノマシン社製) を用いて調製した。5% 懸濁液を出発材料とし、 200MPa 、16 pass の処理条件で、メジアン径 $4\mu\text{m}$ のスラリー状微小化セルロース懸濁液を得た。微小化セルロースのメジアン径は、レーザー回折/散乱式粒度分布測定装置 (堀場製作所製 LA-910W) を用いて求めた。

ナノ結晶セルロースは、既報にしたがって綿由来セルロース (ワットマン製 CF11) から調製した (Araki *et al.*, 2001)。セルロース粉末 10g を 95°C に加熱した 100ml の 2.5N 塩酸に加え、還流冷却器を取り付けて 15 分間スターラーで攪拌した。終了後、プフナーロート上でイオン交換水を用いてろ液が中性になるまで洗浄した。フィルターケーキを回収し、 200ml の水中に分散した後、Waring 型ブレンダー (日本電器株式会

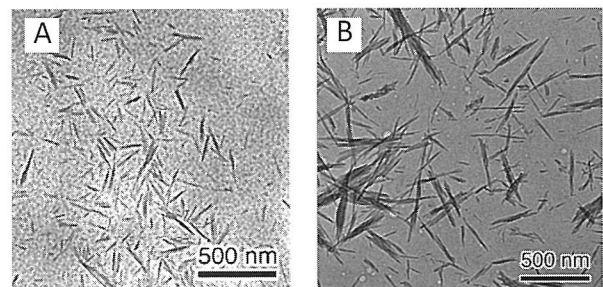


Fig. 1 Transmission electron micrographs of nano-sized whiskers.

Nano-sized whiskers were prepared from cellulose (A) and chitin (B) by chemical hydrolysis.

社 STK-9323)で40分間粉碎した。得られたスラリーを遠心分離 (1600 g, 5 min) し、沈降しないナノ結晶を含む懸濁液を回収した。沈殿は再びイオン交換水に分散させて遠心分離し、同様にナノ結晶懸濁液を繰り返し回収した。最後に回収した懸濁液をイオン交換水で透析し、ナノ結晶セルロース懸濁液を得た。ナノ結晶キチンはカニ殻由来粉末キチン (ナカライテスク) から調製した (Revol & Marchessault, 1993)。粉末キチン 5 g を 3 N 塩酸 100 ml に加えてスターラーで均一に懸濁し、上部に還流冷却器を取り付けて 100°C のウォーターバスで 3 時間加熱した。100 ml の蒸留水を加えて室温まで冷ました後に、遠心処理 (1,600 rpm, 5 分間) によりキチン沈殿を回収した。この沈殿に適量の蒸留水を加えて懸濁したのち、再度遠心する操作を遠心後の上清がコロイド状の液相と透明な液相の 2 層に分離するまで繰り返し行った。続いて、透明な液相は除去し、コロイド状の液相のみを回収した。残った沈殿部は再度蒸留水に懸濁し遠心後、コロイド状の液相を回収する操作を繰り返した。回収したコロイド液相をひとまとめにして蒸留水に対して透析し、ナノ結晶キチン懸濁液を得た。調製した各種懸濁液の一定量を 70°C で 12 時間乾燥させ、残存した重量を測定することにより、ナノ結晶セルロースおよびキチンの濃度を決定した。また、ナノ結晶のサイズは、透過型電子顕微鏡 (JEOL JEM-2100EX) を用いた観察により推定した。

セルロースを炭素源とする集積培養 粉末セルロース、微小化セルロース、ナノ結晶セルロースを炭素源とする集積培養では、合成培地として Sørensen 培地、富栄養培地として YEC 培地を用いた (山里ほか, 2001)。培養容器は 30 ml のガスクロバイアルを用い、各セルロースを 1% 含む培地 10 ml を入れた。好気培養の場合はシリコセンをしてそのまま、嫌気培養の場合にはブチルゴム栓をし沸騰水浴中で 1 分間窒素置換を行い液相・気相の酸素を除いた状態としてから、それぞれオートクレーブ滅菌した。各種の微生物接種源を接種したのち、30°C または 50°C で静置培養を行った。好気、嫌気いずれの培養においても、1 週間ごとに培養バイアル瓶を振って内容を攪拌し、1 ヶ月ごとに培養液 1 ml を同組成の新鮮培地 10 ml に移植し再び培養を継続した。嫌気培養における植菌および継代操作は嫌気チャンバー内で行った。培地中に残存するセルロース量はフェノール硫酸法 (Hodge & Hofreiter, 1962) により定量した。

キチンを炭素源とする集積培養 ナノ結晶及び粉末キチンを炭素源とする集積培養には M9 合成培地を用い、シリコセンを付けた三角フラスコで 25-30°C で振とう培養を行った。継代を行う際には、培養液を新鮮培地に 1/50 容量移植した。

土壌、河川水、堀水へのキチン投与実験 土壌へのキチン投与実験の試験区は、信州大学繊維学部附属農場の圃場内に、1 m 四方の 2 試験区 (キチン投与区、無投与区) を用意した。キチン投与区には、キチン 3 kg (土壌に対する重量比で 1% 相当) を 30 cm の深さまでよく混ぜ込んだ。キチンはアセチル化度 94% のフレーク状のもの (共和テクノス製) を用いた。土壌のサンプリングは、定期的 (1~2 週間ごと) に半年間にわたって行った。各試験区の中央と四辺部の 5 カ所から 30 cm の深さまで土壌を掘り出し、これらを併せてよく混合し植物の根や石などの大きな粒子を取り除いた後に DNA 調製に用いた。千曲川河川水、上田城堀水、繊維学部附属農場の圃場のそれぞれに、フレーク状キチン 5 g を封入したナイロン製ネットを設置し、定期的に回収し分解の程度を観察した。また、水道水でよく洗浄後、キチン表面に強く付着している微生物から DNA を調製した。

16S rDNA に対する PCR-DGGE 分析 培養液中の菌体からの全 DNA 抽出は塩化ベンジルを用いる既報により行った (Zhu *et al.*, 1993)。また、土壌中およびフレークキチン表面に吸着した微生物からの全 DNA 抽出は ISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン) により行った。16S rDNA の PCR 増幅には、V3 領域を含むように設計した 357Fw (5'-CCTACGG GAGGCAGCAG-3') と 517Rv (5'-ATTACCGCGGC TGCTGG-3') のオリゴヌクレオチド、あるいは V6, V7, V8 可変領域を含むように設計した 968Fw (5'-AA CGCGAAGAACCTTAC-3') と 1401Rv (5'-CGGTG TGTACAAGGCC -3') のオリゴヌクレオチドを PCR プライマーとして用いた。DGGE で分析する際にはオリゴヌクレオチド 357Fw と 968Fw の 5' 末端に 40 塩基からなる GC クランプを付加した。PCR は通常の反応液に終濃度 0.01% の牛血清アルブミン (BSA) (Takara, 分子生物学実験用) を加え、ステップ 1: 96°C, 4 分, 続いてステップ 2: 96°C, 1 分, ステップ 3: 58°C, 1 分, ステップ 4: 72°C, 1 分からなる一連のステップを 35 サイクル、最後にステップ 5: 72°C, 4 分のプログラムを用いた。DGGE には DCode システム (バイオラッドラボラトリーズ) を用い、0.5×TAE (pH 8.3) 中、6% ポリアクリルアミド /

20%変性剤-12%ポリアクリルアミド/60%変性剤のゲルを用いて60℃にて50Vで30分間、続いて150Vで6時間泳動した。変性剤濃度100%は7M尿素、40%脱イオン化ホルムアミドに相当する。泳動後のゲルはSYBR Green IまたはGelstar Nucleic Acid Stain (Takara)により染色し、UV照射にてDNAバンドを検出した。

DNA塩基配列決定と相同性検索 PCR産物のクローニングには、Mighty TA-cloning Kit (タカラバイオ)を用い、pMD20-Tベクターとライゲーションさせたのち*E. coli* JM109に形質転換した。ランダムに選んだ形質転換体コロニーに対してユニバーサルプライマーM4とRVを用いたコロニーPCRを行い、予想サイズのDNA増幅断片が確認できるクローンを選抜した。FlexiPrep Kit (GEヘルスケアサイエンス)を用いて調製したプラスミドDNAをグライナー・ジャパン社のワンパスプレミックス96ウェルプレート解析サービスに供した。DGGEゲルのバンドより抽出したDNA断片の塩基配列を決定する際には、最初にGCクランプを持たないプライマーセットにより再度PCRを行った。得られた増幅DNA断片を鋳型にして、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いてシーケンス反応を行い、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)によって塩基配列を決定した。決定した塩基配列の相同性検索はBLAST (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast-j.html>)により行い、さらに、GENETYX-MAC Network Version 14.0.11 (ゼネテックス)を用いて塩基配列のアライメントを作成した。

細菌の同定試験 グラム染色は、フェイバーG「ニッスイ」(日水製薬)を用い、光学顕微鏡BX50F4(オリンパス)を用いて形態観察を行った。16S rRNA遺伝子の塩基配列アライメントにはClustal X2を用い、系統樹作成には、PHYLIP (PHYLogeny Inference Package)のNeighbor programを用いた(Thompson *et al.*, 1997)。生理・生化学試験については、酵素活性についてはAPI ZYM (bioMerieux)を、炭素源の資化能調査についてはAPI20NE, API 50CH (bioMerieux)を用いて行った。オキシダーゼ活性については、1%tetramethyl-*p*-phenylenediamineの酸化の有無で調査した。細胞に含まれる脂肪酸組成はガスクロマトグラフィにより調査した(Sasser, 1990)。ゲノムDNAのGC含量は、Yamasa GC kit (Yamasa Shoyu)を用いてサンプルを調製しHPLCにより決定した(Mesbah *et al.*, 1989)。細胞内

キノンの分析は、凍結乾燥した細胞からクロロホルム-メタノール混液(2:1, v/v)を用いてイソプレノイドキノンを抽出し、薄層クロマトグラフィーで展開後(展開溶媒:n-ヘキサン, ジエチルエーテル混液(85:15, v/v)), 紫外線を照射下で展開スポットを検出した。細胞内ユビキノンはアセトンを用いて抽出し、Nacalai ODS 5C18 columns (4.6×50 mm)を用いたHPLC (Shimadzu LC-10A)によって分析した。細胞の透過型電子顕微鏡像の撮影は(株)日本電子に委託した。

ゲノムライブラリーの作成とキチン分解酵素遺伝子の単離 *Chitiniphilus shinanonensis* SAY3株細胞からのゲノム調製は、Nexttec™ Genomic DNA Isolation kit for Bacteria (Nexttec)を用いて行った。調製したゲノムDNA溶液は超音波破碎により、DNAの平均サイズを40 kbp程度まで断片化しライブラリーの構築に用いた。ゲノムライブラリーの構築は、fosmidベクターpCC1FOSを用いてCopyControl™ Fosmid Library Production Kit (EPICENTRE BIOTECHNOLOGY)に添付されたマニュアルにしたがって行った。ゲノムライブラリーを構成する大腸菌EPI 300株クローンをキチン分解活性検出用合成基質4-methylumbelliferyl (4MU)-*N*-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) (8 mM)および4MU-(GlcNAc)₃ (1 mM)を含有したM9合成培地(36 μg/mlクロラムフェニコール含有)に塗布し、37℃で一晩培養した。紫外線照射下でコロニー周辺に青色の蛍光を発するキチン分解酵素発現クローンを選抜した。10個の陽性クローンからQIAGEN Large-Construct Kit (QIAGEN)を用いて組換えfosmid DNAを調製した。そのDNA混合物を次世代シーケンサーGenome Sequence FLX (ロシュダイアグノスティクス)に供し、インサートの塩基配列を決定した(タカラバイオ受託サービス)。決定した塩基配列からキチン分解酵素関連遺伝子を探索するため、BLAST (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/blast-j.html>), ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>)を用いた。シグナル配列の推定にはSignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)を、糖質加水分解酵素のファミリー決定にはpfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>)およびcazy (<http://www.cazy.org/>)を用いた。

ナノ結晶を用いた大腸菌の形質転換法 LB液体培地を用いて、大腸菌JM109株を30℃にて18時間振とう培養した。培養液の濁度(OD₅₅₀)が3.0、細胞数が6.0×10⁸/mlとなった段階の培養液を以下の操作に使用した。ナノ結晶キチンとプラスミドpUC18 DNAを

それぞれ濃度が 5 ng/ml, 20 ng/ml となるように混合した懸濁液 50 μ l に大腸菌培養液 50 μ l を加えて, LB 寒天培地 (寒天濃度 2.5%, アンピシリン 100 μ g/ml 含有) 上に滴下した. 続いて, Gene injector (プリス社) を用いてポリスチレン製ストリークバー (Sarstedt, Germany) を寒天培地に接触させ, ストリークバーの垂直抗力を 40 g に保ち, 寒天培地プレートを 90 rpm, 60 秒間回転運動させることによりすべり摩擦刺激を与えた. その後, 寒天培地プレートを 37 $^{\circ}$ C, 15-18 時間インキュベートし, 形成されたアンピシリン耐性コロニー数を計測した. 形質転換効率 は pUC18 DNA 1 μ g 当たり得られたコロニー数として算出した.

結 果

微小化セルロースを用いた集積培養 ジェット水流下で結晶性粉末セルロース (PC と略記, メジアン径 35 μ m) を衝突破碎して得た微小化セルロース (MC と略記, メジアン径 4 μ m) を炭素源として用い, 培地の種類 (Sørensen 合成培地と YEC 栄養培地), 培養温度 (30 $^{\circ}$ C と 50 $^{\circ}$ C), 気相 (好気条件と嫌気条件) の計 8 通りの組合せの培養条件で集積培養を開始した. 微生物の接種源は, 防火用貯水地底泥, 水田土壌, 庭木剪定枝チップ堆積腐葉土, 生ゴミ堆肥, 土壌育成用肥料ペレット, 下水汚泥堆肥, 雑草・伐採枝集積地土壌と異なる 7 種類の環境から得た.

1ヶ月ごとの継代時にセルロースの残量を定量し, MC と PC の双方で減少の認められなかった試験区は

培養を中止した. 全体として, 接種源と培養条件が同一である試験区を比較すると, PC よりも径の小さな MC でより速い減少が見られる傾向があった (データ示さず). 培養 6 ヶ月目の時点まで, いずれかの炭素源でセルロース減少が認められ実験が継続された試験区は以下の 5 通りである.

接種源を防火用貯水地底泥とした YEC 培地, 好気培養, 30 $^{\circ}$ C と 50 $^{\circ}$ C

接種源を生ゴミ堆肥とした YEC 培地, 好気培養, 30 $^{\circ}$ C と 50 $^{\circ}$ C

接種源を生ゴミ堆肥とした Sørensen 培地, 好気培養, 50 $^{\circ}$ C

結果的に, 6ヶ月間の継代において, セルロース分解は好気条件でのみ認められた. また, 上記 5 試験区中の 4 試験区において MC の分解速度が PC よりも優れていた. しかし, 「接種源を生ゴミ堆肥とした YEC 培地, 好気培養, 30 $^{\circ}$ C 試験区」では, PC の分解速度が MC よりも速かった (データ示さず). このうち, 最も MC 分解速度が高かった「接種源を防火用貯水地底泥とした YEC 培地, 好気培養, 50 $^{\circ}$ C 試験区」について詳細な解析を行った. なお, このとき PC と MC で形成された微生物群をそれぞれ YPC50, YMC50 と表記した.

両微生物群より抽出した DNA をテンプレートに用いて, 16S rDNA の V3 可変領域を含む PCR 増幅 DNA 断片の DGGE 解析像を示した (Fig. 2A). 培養 3ヶ月目まではバンドパターンの変化が大きかったが, 4ヶ月目より一定のバンドが認められるようになり菌叢が安定してくる傾向が見られた. 両微生物群に

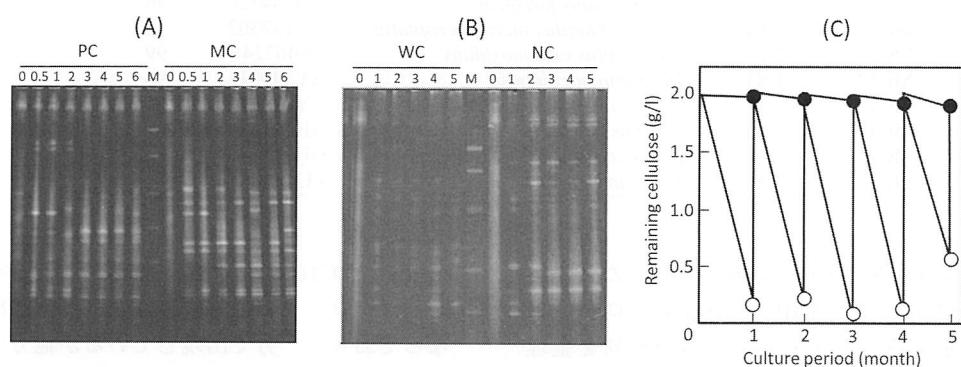


Fig. 2 Analysis of microbial community in enrichment culture using various cellulose as a carbon source. PCR-amplified 16S rDNAs using total DNAs prepared from each successive culture were analyzed by DGGE for the enrichment culture containing a combination of PC and MC (A) or WC and NC (B). The culture condition was aerobic in YEC medium at 50 $^{\circ}$ C, and the source of inoculum was mud of water reservoir. Numerals denote culture period (month). M: DGGE marker I (Wako Junyaku). (C) The amount of remaining cellulose after each successive culture in the enrichment culture containing WC and NC (corresponding to the DGGE pattern of B). The initial amount of cellulose in the medium was 2.0 g/l. The remaining cellulose in the culture with WC (closed circle) and NC (open circle).

Table 1 Sequence analysis of the cloned 16S rDNAs amplified from the microbial community in enrichment culture with powdered cellulose (PC) or micro crystalline cellulose (MC)

OTU	Appearance frequency	Bacterial species with the highest 16S rDNA sequence similarity		
		Taxon	Accession no.	% Similarity
PC1	12/89	<i>Chelatococcus daeguensis</i>	EU822295	99-100
PC2	9/89	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	GU137302	98-100
PC3	9/89	<i>Bacteriovorax</i> sp.	EU443967	93-95
PC4	7/89	<i>Alkaliphilus crotonoxidans</i>	AF467248	97-99
PC5	7/89	<i>Bacillus thermocloacae</i>	Z26939	99-100
PC6	4/89	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	EU982481	92-93
PC7	4/89	<i>Paenibacillus campinasensis</i>	EU169230	95-97
PC8	4/89	<i>Hyphomicrobium hollandicum</i>	Y14303	97-99
PC9	4/89	Bacilli bacterium	AB362269	86
PC10	3/89	<i>Symbiobacterium thermophilum</i>	AP006840	100
PC11	3/89	<i>Clostridium thermosuccinogenes</i>	Y18180	100
PC12	3/89	<i>Tepidimicrobium ferriphilum</i>	GQ461826	97-100
PC13	3/89	Myxococcales bacterium	AB245340	97-98
PC14	2/89	<i>Thermobacillus xylanilyticus</i>	AJ005795	96-97
PC15	2/89	<i>Bacillus farraginis</i>	AY443035	99
PC16	1/89	<i>Desulfotomaculum</i> sp.	AY340811	96
PC17	1/89	<i>Paenibacillus alvei</i>	GU186841	93
PC18	1/89	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	EU249590	90
PC19	1/89	<i>Brevibacillus thermoruber</i>	GU137300	100
PC20	1/89	<i>Clostridium caenicola</i>	AB221372	98
PC21	1/89	<i>Bacillus circulans</i>	Y13065	99
PC22	1/89	<i>Bacillus</i> sp.	AB375754	100
PC23	1/89	<i>Azonexus fungiphilus</i>	AJ630292	99
PC24	1/89	<i>Proteiniborus ethanologenes</i>	EF116488	98
PC25	1/89	<i>Sphaerobacter thermophilus</i>	CP001824	98
PC26	1/89	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	X87279	95
PC27	1/89	<i>Moorella perchloratireducens</i>	EF060194	92
PC28	1/89	<i>Thermoanaerobacter</i> sp.	AB062280	91
MC1	26/84	Lachnospiraceae bacterium	DQ789118	97-98
MC2	10/84	Clostridia bacterium	GU136561	93-94
MC3	9/84	<i>Symbiobacterium</i> sp.	AB361629	99-100
MC4	8/84	<i>Chelatococcus daeguensis</i>	EU822295	98-100
MC5	8/84	Unidentified eubacterium	AJ229225	92
MC6	5/84	<i>Symbiobacterium thermophilum</i>	AP006840	98-100
MC7	5/84	<i>Desulfotomaculum reducens</i>	CP000612	96
MC8	4/84	<i>Clostridium thomosuccinogenes</i>	Y18180	100
MC9	2/84	<i>Paenibacillus terrigena</i>	GQ284528	96
MC10	1/84	<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	GU137302	100
MC11	1/84	<i>Alkaliphilus crotonoxidans</i>	AF467248	99
MC12	1/84	<i>Desulfotomaculum</i> sp.	AY340811	96
MC13	1/84	<i>Paenibacillus daejeonensis</i>	AY032949	95
MC14	1/84	<i>Bacillus nealsonii</i>	AB547220	98
MC15	1/84	<i>Pedomicrobium ferrugineum</i>	GU269548	97
MC16	1/84	<i>Bacteriovorax</i> sp.	EU443967	95

ついて6ヶ月目の時点でクローン解析を行った結果、YPC50から89クローン、YMC50から84クローンの塩基配列を決定することができた。同一配列を整理し、互いに異なる配列をすべてBLAST検索にかけ、得られた相同配列の生物属種が同じクローン間で97%以上の相同性がある場合には同じ operational taxonomic unit (OTU) として扱った (Table 1)。微生物群 YPC50 で28、微生物群 YMC50 で16の OTU が見いだされ、そのうち7つは両者に共通して見いだされた (PC1=MC4, PC2=MC10, PC3=MC16, PC4

=MC11, PC10=MC6, PC11=MC8, PC16=MC12)。しかし、クローンの出現頻度は PC と MC 間で大きく異なっており、一方で出現しているが他方で出現していない OTU が相当数あることから、炭素源となるセルロースの形状の相違だけで菌叢中の優占種が大きく変化することが示された。また、微生物群 YPC50 では PC がほとんど分解されていないのに対し、MC の著しい分解が見られた微生物群 YMC50 で優占種として出現している OTU-MC1 と OTU-MC2 を与える細菌種は MC の分解資化に特化している可能性が高い。配列

Table 2 Sequence analysis of the cloned 16S rDNAs amplified from the microbial community in enrichment culture with cotton cellulose powder (WC) or nano-sized whisker of cellulose (NC)

OTU	Appearance frequency	Bacterial species with the highest 16S rDNA sequence similarity		
		Taxon	Accession no.	% Similarity
WC1	27/92	Clostridiaceae bacterium AeB	FJ481102	97-99
WC2	18/92	<i>Clostridium tertium</i>	AB618789	99-100
WC3	10/92	<i>Desulfotomaculum reducens</i> MI-1	CP000612	95-96
WC4	8/92	<i>Sporanaerobacter</i> sp. SN28	EU887812	97-98
WC5	6/92	<i>Clostridium</i> sp. 6-31	FJ808611	99-100
WC6	5/92	<i>Symbiobacterium</i> sp. KA13	AB455239	99-100
WC7	3/92	Clostridiales bacterium 77-5d	HQ452857	99
WC8	3/92	<i>Clostridium</i> sp. 6-12	FJ808612	97-100
WC9	3/92	<i>Desulfotomaculum</i> sp. MPNeg1	AY340811	95-96
WC10	2/92	<i>Clostridium</i> sp. C40-2	AB059477	97
WC11	1/92	<i>Symbiobacterium</i> sp. KY38	AB361629	100
WC12	1/92	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	X71847	97
WC13	1/92	<i>Clostridium</i> sp. PML3-1	EF165015	99
WC14	1/92	<i>Sporolituus thermophilus</i> strain AeG	FJ169187	99
WC15	1/92	Lachnospiraceae bacterium A4	DQ789118	98
WC16	1/92	<i>Propionispora hippei</i>	AJ508927	94
WC17	1/92	<i>Clostridium</i> sp. 6-31	FJ808611	94
NC1	61/94	<i>Clostridium</i> sp. 6-31	FJ808611	97-100
NC2	19/94	<i>Clostridium cellulolyticum</i>	X71847	97
NC3	8/94	<i>Propionispora hippei</i>	AJ508927	93-94
NC4	2/94	<i>Propionispora hippei</i>	AJ508927	91
NC5	2/94	<i>Clostridium caenicola</i>	AB221372	97-98
NC6	1/94	Clostridiaceae bacterium acetate-1	FN557300	100
NC7	1/94	Clostridiaceae bacterium acetate-1	FN557300	96

相同性からはどちらも *Firmicutes*, *Clostridia*, *Clostridiales* 傘下に入る細菌であり、セルロース資化能を有することは十分に予想できる。しかし、既知細菌種との 16S rDNA 配列相同性が高くないこと (93-98%) を考えると新種のセルロース分解細菌であることが期待された。

ナノ結晶セルロースを用いた集積培養 続いて、綿由来セルロース粉末 (WC と略記, 径 20 - 50 μm) を酸加水分解して調製したナノ結晶セルロース (NC と略記, 径 10 - 20 nm, 長さ 100 - 200 nm) を炭素源として、前述の微少化セルロースと同じ条件で継代培養を行った。微生物接種源として、前述の実験で MC を効率よく分解する微生物群が得られた防火用貯水地底泥を用いた。ほとんどの試験区で、WC と NC のどちらもある程度分解する傾向が見られた中で、「YEC 培地, 嫌気培養, 50℃ の試験区」では WC はほとんど分解されないのに対して NC がほぼ完全に分解された (Fig. 2C)。この試験区では NC 分解に特化した微生物群が集積された可能性が高いと考え、構成する微生物

群の解析を進めた。ここで、WC で得られた微生物群を YWC50, NC で得られた微生物群を YNC50 と表記した。

各微生物群から抽出した全 DNA をテンプレートに用いて増幅した 16S rDNA 断片の DGGE 解析像を示した (Fig. 2B)。培養開始時 (底泥) は、明確なバンドが得られないほど混沌とした微生物群であったが、継代が進むにつれてバンド数が収束し安定化した。また、継代培養 5 ヶ月目において WC と NC 間でバンドパターンは明確に異なっていた。すなわち、セルロースの形状相違によって集積されてくる分解細菌種が大きく変化することが示された。この時点の両微生物群に対してクローン解析を行った結果、YWC50 で 92 クローン、YNC50 で 94 クローンの塩基配列を決定することができた (Table 2)。

YWC50 で 17, YNC50 で 7 の OTU が見いだされ、そのうち 3 つは両者に共通して見いだされた (WC5 = NC1, WC12 = NC2, WC16 = NC3)。しかし、共通クローンの出現頻度は大きく異なっており、微生物群 YWC50 では比較的出現頻度が低い OTU が微生物群

YNC50では圧倒的優勢となっていた。さらに、微生物群 YWC50 で出現しているが、微生物群 YNC50 では 100 クローン程度の解析では出現してこない OTU が相当数あることが明らかとなった。NC 培養微生物群では、最も高い相同性を示す既知細菌種が同一であるにもかかわらず、互いの相同性が 97% 以下のため、別の OTU に分類されたクローンは 2 系統あった (NC3 と NC4, NC6 と NC7)。これらを含めてもわずか 7 種の OTU しか見いだされなかったことから、NC を炭素源とした場合には NC の分解資化に特化した優占種が出現していることが強く示唆された。今後、これらの株を分離し、セルロース分解酵素系について調査することが課題である。

ナノ結晶キチンを用いた集積培養 カニ殻、エビ殻から工業生産されているキチンは、地球上でセルロースに次ぐ豊富なバイオマスである。これまで多くのキチン分解微生物が分離され、そのキチン分解酵素に関する研究がなされてきた (Cohen-Kupiec & Chet, 1998; Keyhani & Roseman, 1999)。ここでは、市販の粉末キチン (径 20 - 50 μm) から酸加水分解によって調製したナノ結晶キチン (径 10 - 20 nm, 長さ 100 - 200 nm) を用いて、微生物が示す分解挙動を比較調査した。

土壌、河川水、堀水、下水処理上返送汚泥と異なる 4 種の微生物源を接種し、粉末キチンまたはナノ結晶キチンを単一炭素源とする合成培地で 5 代にわたる継代培養を行った。ナノ結晶キチンを炭素源とする培養では粉末キチンに比べて、初代の培養から基質の減少が速く、細菌の増殖による濁りも早い時期から認められた。各 5 代目継代培養液の微生物群から調製した DNA をテンプレートに用い、PCR 増幅した 16S rDNA 断片 (V6, V7, V8 可変領域を含む) を DGGE 解析した (Fig. 3A)。形成されるバンドのパターンから、同一の接種源を用いた場合でもナノ結晶と粉末キチン間で集積されてくる細菌種に差があることが明らかとなった。特に、ナノ結晶キチンでのみ出現するバンドについてゲルより DNA を抽出し塩基配列を決定した。BLAST 相同性検索を行った結果、これらの配列は *Ochrobacterium* 属、*Pseudomonas* 属、*Delftia* 属、*Aeromonas* 属、*Stenotrophomonas* 属の細菌種と 99-100% の高い相同性を示した。16S rDNA 配列は細菌を分類する際のひとつの重要な基準として用いられている。2 つの細菌が同一種であると判断するには、両者の配列が 98% 以上の相同性を示すことが一般的な基準とされている (Drancourt *et al.*, 2000)。この基準から判定すると、ナノ結晶キチンで特異的に集積

されてきた細菌種は既知の細菌と同一あるいは極めて近い近縁種と言える。これまでに集積培養に用いたものと同じ組成の寒天培地で該当する細菌の分離を試みてきたが、成功しない例が多かった。ひとつの理由として、共存する他の細菌種と強い共生関係にあるため単独ではコロニー形成しなかったことが考えられる。また、寒天培地の水分活性などの物理的性質が増殖に適さなかった可能性も考えられる。以上、ナノ結晶キチンを用いた培養によって、粉末キチンとは異なる多様なキチン分解細菌を集積できることが示された。また同時に、集積された細菌の中には平板培養法で分離が困難な難培養性のものが含まれていることも明らかとなった。

土壌へのキチン投与がもたらす微生物群の変動 ここまでに述べたのはセルロース、キチンを用いた実験室内での集積培養の結果である。実際の自然環境において、これら多糖の分解利用に関わっている微生物の実態を知るためには複雑な微生物群を網羅的に分析する必要がある。自然環境中に存在する微生物のうち 99% 以上は従来の培養技術によって培養することが困難であると言われている (Riesenfeld *et al.*, 2004; Streit & Schmitz, 2004; Singh *et al.*, 2009)。難培養性微生物も含めて微生物群を解析するひとつの手段として注目を集めているのが、環境中から培養を経ずに直接調製した DNA (環境 DNA) を解析の対象とする手法である (Rodriguez-Valera, 2002; Torsvik & Ovreas, 2002)。rRNA 遺伝子などの保存性の高い配列が環境中の微生物の多様性を評価する際の指標として用いられている (Amann *et al.*, 1995; Clarridge, 2004; Jones *et al.*, 2005)。

そこで、実際にキチンを投与した土壌における微生物群集の変動過程を追跡することで、土壌中のキチン分解細菌種を調査することを試みた。試験区は信州大学繊維学部附属農場の圃場の異なる地点に設定し、30 cm の深さまでの土壌に対して、土壌重量あたり 1% 程度となるようにフレーク状キチンを投与しよく混ぜ込んだ。経時的にサンプリングした土壌から直接調製した環境 DNA をテンプレートに、V6, V7, V8 可変領域を含む 16S rDNA 断片を PCR 増幅し DGGE で解析した (Fig. 3B)。対照の無投与区においては、試験期間中を通じて大きな細菌種の変動が見られなかったのに対して、キチン投与区では特定細菌種の増大を示す複数のバンドの出現が確認された。この結果は、キチンの投与が土壌中の特定の細菌種を増大させることを明確に示すものであり、実際の試験区土壌中では、これらの細菌種がキチンを分解利用し優占種と

Table 3 Sequence analysis of the 16S rDNAs extracted from DGGE bands which appeared after addition of chitin in soil

OTU ^a	Bacterial species with the highest 16S rDNA sequence similarity		
	Name with strain number	% Similarity	Phylum
CH1	<i>Cellvibrio vulgaris</i> NCIMB8633 ^T	98	γ-Proteobacteria
CH2	<i>Cellvibrio mixtus</i> ACM2601 ^T	100	γ-Proteobacteria
CH3	<i>Dyella ginsengisoli</i> KCTC12599 ^T	99	γ-Proteobacteria
CH4	<i>Dyella kareensis</i> NBRC100831 ^T	99	γ-Proteobacteria
CH5	<i>Lysobacter daejeonensis</i> KACC11406 ^T	99	γ-Proteobacteria
CH6	<i>Lysobacter oryzae</i> KCTC22249 ^T	98	γ-Proteobacteria
CH7	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> NBRC101034 ^T	99	γ-Proteobacteria
CH8	<i>Methylococcus capsulatus</i> UNIGEM1 ^T	91	γ-Proteobacteria
CH9	<i>Chondromyces lanuginosus</i> TC4494 ^T	92	δ-Proteobacteria
CH10	<i>Kitasatospora niigatensis</i> NBRC16453 ^T	100	Actinobacteria
CH11	<i>Kitasatospora arboriphila</i> NCIMB13973 ^T	98	Actinobacteria
CH12	<i>Streptomyces bluensis</i> NBRC13460 ^T	96	Actinobacteria

^aDNA bands indicated with closed circles in Fig. 3B were used for sequence analysis

Table 4 Sequence analysis of the 16S rDNAs corresponding to major DGGE bands originated from bacterial cells bound on the surface of chitin

OTU ^a	Bacterial species with the highest 16S rDNA sequence similarity		
	Name with strain number	%Similarity	Phylum
S1	<i>Cellvibrio fulvus</i> NCIMB8634 ^T	99	γ-Proteobacteria
S2	<i>Cellvibrio mixtus</i> ACM2601 ^T	99	γ-Proteobacteria
S3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> NBRC14161 ^T	90	γ-Proteobacteria
S4	<i>Methylobacter psychrophilus</i> Z-0021 ^T	91	γ-Proteobacteria
S5	<i>Pseudomonas fluorescens</i> NCIMB9046 ^T	99	γ-Proteobacteria
S6	<i>Pseudomonas fluorescens</i> NCIMB9046 ^T	94	γ-Proteobacteria
S7	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> DSM13117 ^T	92	γ-Proteobacteria
R1	<i>Clostridium sporosphaeroides</i> DSM1294 ^T	88	Firmicutes
R2	<i>Lactococcus lactis</i> ATCC19435 ^T	97	Firmicutes
R3	<i>Clostridium sporosphaeroides</i> DSM1294 ^T	90	Firmicutes
R4	<i>Lactobacillus plantarum</i> NBRC15891 ^T	89	Firmicutes
R5	<i>Pelosinus fermentans</i> DSM17108 ^T	86	Firmicutes
R6	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> NCIMB8307 ^T	99	δ-Proteobacteria
R7	<i>Anaerovibrio burkinabensis</i> DSM6283 ^T	91	Firmicutes
M1	<i>Clostridium tertium</i> NCIMB10697 ^T	90	Firmicutes
M2	<i>Clostridium cellobioparum</i> LMG5589 ^T	85	Firmicutes
M3	<i>Clostridium sporosphaeroides</i> DSM1294 ^T	93	Firmicutes
M4	<i>Caenimicrobium bisanense</i> K92 ^T	94	α-Proteobacteria
M5	<i>Chitinibacter tainanensis</i> DSM15459 ^T	96	β-Proteobacteria
M6	<i>Zymomonas mobilis</i> ATCC10988 ^T	91	α-Proteobacteria
M7	<i>Streptomyces longispororuber</i> NBRC13488 ^T	100	Actinobacteria

^aFlakes of chitin were collected from soil (S1-S7), river water (R1-R7), and moat water (M1-M7).

なったものと考えられる。

各 16S rDNA バンドの由来細菌種を推定するため、ゲルから抽出した DNA 断片の塩基配列を決定して BLAST 検索を行った (Table 3)。一般に 16S rDNA 配列から同一種であることを判定するためには 98% 以上の identity を示すことが基準とされている (Drancourt *et al.*, 2000)。この基準に照らすと、今回決定した 12 個の配列は既知種由来が 9 個、未知種由来が 3 個と判断できた。

各種自然環境中に設置したキチン表面に付着した細菌群の解析 次に、河川水、堀水も加えた自然環境中にナイロンネットに入れたキチンを設置し、経時的に変化を観察したところ、時間経過とともに色調が変化し分解が起こった。このとき、キチン表面に強く付着した微生物から DNA を調製し、16S rDNA PCR 増幅断片の配列により構成細菌種を調べた。サンプル間で細菌種は大きく異なり、土壌ではほとんどが *Gammmaproteobacteria* 門に属するのに対して、河川水、堀水では *Firmicutes* 門に属する細菌の割合が大きかった。また、21 配列中 16 配列 (76%) は既知細菌種の 16S rDNA 配列との相同性が 97% 以下であり、未同定の細菌種が多く見出された。この中には新規なキチン分解細菌種が含まれることが予想されたが、いずれも通常の平板培養法では分離が困難であり、難培養性細菌と推定された (Table 4)。

これらの未知細菌種を分離するひとつのアプローチとして、上述した異なる 3 種の環境に由来するキチン付着微生物を混合しキチン含有培地で継代を繰り返したところ、4 種類の細菌から構成される安定な細菌群が構築された (データ示さず)。これら 4 種の細菌はいずれもキチン含有寒天培地において分離可能であった。各分離株の 16S rDNA 配列を決定したところ、3 種は既知の細菌種 (*Acinetobacter junii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Microbacterium phyllosphaerae*) と 99% 以上の相同性を示し、ほぼ同一種と判定された。残りの 1 種は、先に示した上田城堀水由来のキチンに付着していた未知細菌種の配列と同一であった。なお、この細菌種は堀水由来のキチン表面付着細菌を単独でキチン含有培地で培養した際には分離することができなかった。混合培養によって組み合わせられた 4 種の細菌間において何らかの依存関係が生じた結果、培養分離が可能になったと思われる。この分離株はキチン含有寒天培地で旺盛な増殖とキチンの酵素分解に伴う溶解斑を示し、強力なキチン分解能をもつことがわかった (Fig. 4)。

新属のキチン分解細菌種の同定試験 先に示した強力なキチン分解能を示す株 (SAY3 株と命名) は、16S rDNA 配列から未同定の新種細菌であることが推定されたので、本株の詳細な同定試験を行った (Fig. 4)。本株の細胞形態は、グラム陰性で 1 本の長い極鞭毛を持

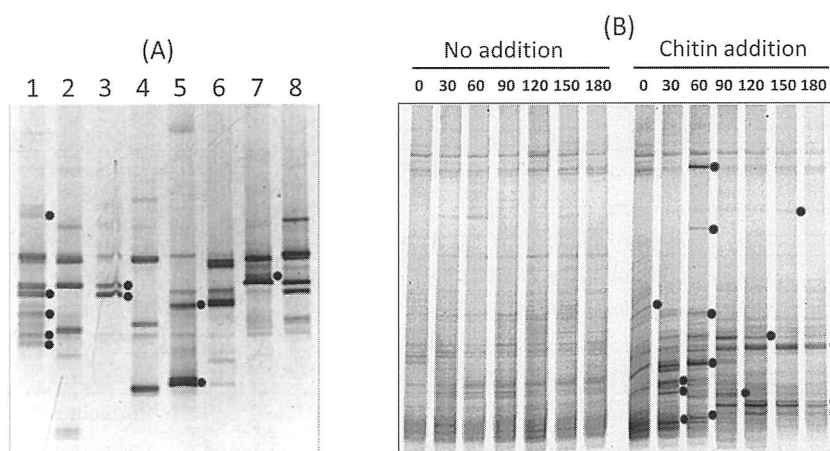
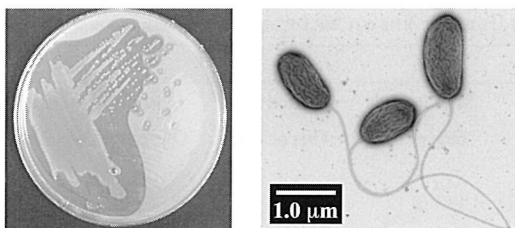


Fig. 3 Analysis of bacterial community by PCR-DGGE targeting 16S rDNAs.

(A) Bacterial community after the 5th successive culture in medium containing nano-sized chitin whisker (lane 1, 3, 5 and 7) or particle chitin (lane 2, 4, 6 and 8) as a carbon source. The sources of inoculum were river water (lane 1 and 2), soil (lane 3 and 4), moat water (lane 5 and 6), and active sludge (lane 7 and 8). DNA bands appeared only in the culture with nano-sized chitin whisker were dotted with closed circles.

(B) Soil-borne bacterial community in untreated soil and in soil with chitin addition. Lane numbers indicate days after addition of chitin. Closed circles indicate the fluorescent bands that were used in the determination of nucleotide sequences.



Gram-negative, non-spore-forming, curved rods
0.7-0.8 mm in width and 1.2-1.5 mm in length
Motile by means of a single polar flagellum
Facultatively anaerobic, oxidase-, catalase-positive
Does not produce acid from glucose
Positive for nitrate reduction
Major cellular fatty acids are 16:1 w7c and 16:0
Q-8 is the predominant isoprenoid quinone
The DNA G+C content of the type strain of the type species is 67.6 mol%
Phylogenetically belongs to the family
Neisseriaceae in the class Betaproteobacteria
The type species of the genus is *Chitiniphilus shinanonensis*

Fig. 4 Taxonomic characters of the novel chitin-degrading bacterium *Chitiniphilus shinanonensis* gen. nov., sp. nov.

Left photo, growth on synthetic agar plate containing colloidal chitin as the sole carbon source; Right photo, transmission electron micrograph of the strain SAY3.

つ短桿菌であった。16S rDNA の全長配列 (1494 bp) を決定し、BLAST 検索を行ったところ最も相同性の高い株は *Formivibrio citricus* であったが、その相同性は 93.6% という低い値であった。また、相同性を示した上位 12 種の細菌が全て *Betaproteobacteria* 門の *Neisseriaceae* 科に属する細菌であったため、SAY3 株も *Neisseriaceae* 科に属することが示唆された。*Neisseriaceae* 科の各属の基準種基準株の 16S rDNA 配列を SAY3 株のものとあわせて系統樹解析を行ったところ、SAY3 株は *Formivibrio* 属、*Silvimonas* 属、*Prevotia* 属、*Chitinibacter* 属、*Deefgea* 属、*Iodobacter* 属の各基準種基準株が構成するクラスター内に含まれていることが確認された (データ示さず)。SAY3 株の生理生化学的試験結果について、系統樹において同じクラスターに含まれた上記の 6 属の基準種基準株の性質と比較した (Table 5)。その結果、SAY3 株は 6 細菌種のいずれとも複数の試験項目で異なった性質を示した。特に、ゲノム DNA の GC 含量 (67.6%) は 6 細菌種と比較して明らかに高い値を示した。

以上の結果を総合的に判断して、SAY3 株は *Neisseriaceae* 科の新属を形成する細菌種と判定した。本株を新属新種の細菌 *Chitiniphilus shinanonensis*

と命名し、International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology の validation list に登録し (Euzéby, 2009)、SAY3 株を基準株 (type strain) として寄託保存した。SAY3 株の全長 16S rDNA 配列は、DDBJ/GenBank/EMBL database に accession number AB453176 として登録した。

C. shinanonensis SAY3 株のキチン分解酵素遺伝子の単離

C. shinanonensis SAY3 株の強力なキチン分解系を明らかにするため、フォスミド (fosmid) を用いてゲノムライブラリーを作成した。ライブラリーは平均インサート長が 40 kbp、大腸菌クローン数が 5000 個から構成され、一般的な細菌のゲノムサイズを十分にカバーするものであった。ライブラリーよりキチン分解活性を発現するクローン 10 個を選抜し、次世代シーケンサーで総コンティグ (contig) 長が 226 kbp からなる塩基配列を決定した。ORF 探索および BLAST 検索を繰り返した結果、計 15 個のキチン分解酵素様遺伝子を見出すことができた。一般に、高分子の不溶性多糖であるキチンを分解する酵素は 2 種類知られている。ひとつはキチン鎖の内部をランダムに分解するエンド型キチナーゼ (chitinase, E. C. 3.2.1.14) であり、N-アセチルグルコサミン (N-acetyl-D-glucosamine, GlcNAc) の 2 量体を主とする GlcNAc オリゴ糖を生成する。もうひとつは、GlcNAc オリゴ糖の非還元末端から GlcNAc 単位でエキソ型に切断する β -N-アセチルグルコサミニダーゼ (β -N-acetylglucosaminidase, E.C.3.2.1.52) である (Cohen-Kupiec & Chet, 1998; Keyhani & Roseman, 1999)。基本的には、これら両酵素が揃えばキチンを分解資化できることになり、キチン資化細菌の中には各酵素をコードする遺伝子を 1 から 2 個ずつ保持するものが知られている (Lan *et al.*, 2006)。それに対して、土壌中の主要なキチン分解菌として知られる *Streptomyces* 属放線菌および水圏の代表的キチン分解細菌である *Vibrio* 属細菌では、そのゲノム上に 10 個以上のキチン分解酵素遺伝子が見出されている (Meibom *et al.*, 2004)。*C. shinanonensis* においても 15 個という多くのキチン分解酵素遺伝子を保持することによって、強力なキチン分解能を獲得したものと予想される。

これら 15 個の遺伝子産物 (ChiA~ChiO) に予想されるドメイン構造を Fig. 5 にまとめた。各 ORF のアミノ酸配列を BLAST 検索にかけたところ、13 個 (ChiA~ChiE, ChiG, ChiH, ChiJ~ChiO) はエンド型キチナーゼに相同性を示した。糖質加水分解酵素の分類において、エンド型キチナーゼは活性ドメイン配列の相同性をもとにして、2 つのファミリー (family 18 と

Table 5 Taxonomic characteristics differentiating the strain SAY3 from the known bacteria in the family *Neisseriaceae*

Property	1	2	3	4	5	6	7
Morphology	Curved rods	Curved rods	Rods	Straight rods	Rods	Rods	Rods
Number of polar flagella	One	One	One	One or two	One or two	One or two	One or two
Anaerobic growth	+	+	+	-	-	+	-
Catalase	+	-	+	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	-	-	-	+	+	-	+
Chitin hydrolysis	+	-	+	+	+	-	w
Nitrate reduction	+	-	+	-	-	+	+
Acid production from glucose	-	ND	+	+	-	-	-
Utilization of:							
Ribose	+	ND	-	+	-	+	+
Sucrose	-	-	+	-	-	+	-
<i>N</i> -Acetylglucosamine	+	ND	+	+	+	w	+
Cellular fatty acid (% of total):							
C12:0 3-OH	5.3	Tr	-	2.0	4.0	2.5	2.5
C14:0	1.4	-	6.4	0.6	Tr	2.0	8.4
C14:0 3-OH	-	9.5	-	-	-	2.0	-
10-Methyl C19:0	-	-	-	-	1.7	-	-
Major quinone	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8
DNA G+C content (mol%)	67.6	59	58	62	56	48.5	51

Taxa: 1, strain SAY3 isolated in this work; 2, *Formivibrio citricus* DSM6150^T; 3, *Silvimonas terrae* KM-45^T; 4, *Andreprevotia chitinilytica* JS11-7^T; 5, *Chitinibacter tainanensis* BCRC17254^T; 6, *Deefgea rivuli* WB3.4-79^T; 7, *Iodobacter fluvialtilis* ATCC33051^T. +, positive; -, negative; w, weak; Tr, trace; ND, no data.

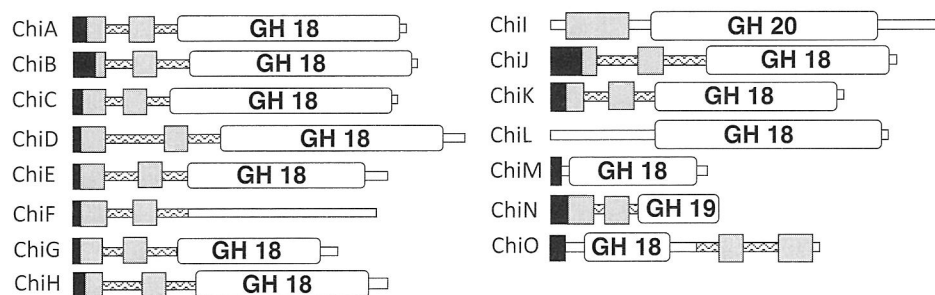


Fig. 5 Deduced domain structures of polypeptides encoded by 15 genes coding for chitinolytic enzymes in *C. shinanonensis*. Black boxes, signal peptide; gray boxes, chitin-binding domain; white boxes, glycosyl hydrolase (GH) catalytic domain with a family number; waved bars, proline-, threonine-, valine-rich linker region.

19) に大別される (Henrissat & Bairoch, 1996). 13 個のエンド型キチナーゼ様 ORF 配列のうち, 12個は family 18 に 1 個 (ChiN) のみが family 19 に分類された. 残りの 2 個の ORF のうち, 1 個 (ChiI) はエキソ型の β -*N*-acetylglucosaminidase (family 20) に類似性を示した. もう一方の ChiF はキチン結合ドメインは保持するが, キチン分解酵素の活性ドメインに類似したアミノ酸配列は存在しなかった. 13 個の ORF の N 末端にはシグナル配列の存在が高い信頼性

で判定され, これらのポリペプチドは細胞外に分泌されることが予想された. それに対して, 2 個の ORF (ChiI, ChiL) の N 末端にはシグナル配列が存在しなかった. 5 個の連続する ORF (ChiC~ChiG) の間にはプロモーター様配列が存在せず ORF 間の距離も短い (135~217 bp) ことから, オペロンを形成し単一の mRNA 分子として転写される可能性が示唆された. また, キチン結合ドメイン間および活性ドメインとの間には, プロリン, スレオニン, バリン残基に富

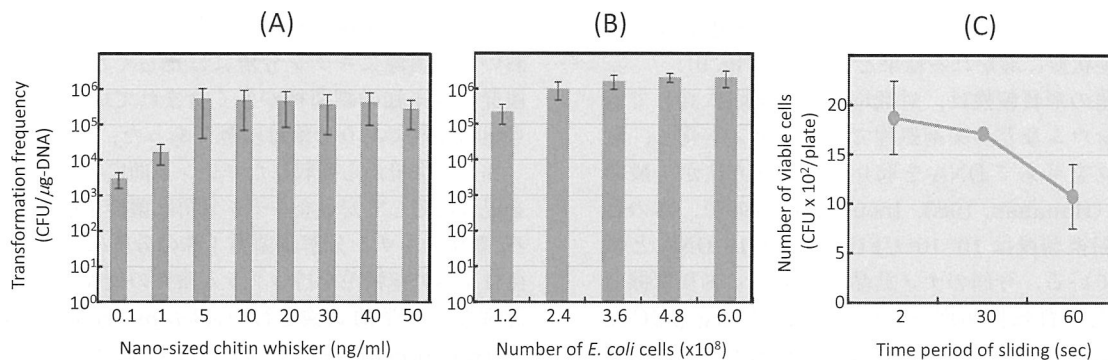


Fig. 6 Transformation frequencies of *E. coli* cells mediated by sliding friction with nano-sized whiskers of chitin. (A) Effect of nano-sized chitin whisker concentration on transformation frequency. (B) Effect of cell numbers of *E. coli* on transformation frequency. (C) Reduction in number of viable cells during time period of sliding friction. All of the experiments were carried out in duplicate and repeated three times. Values indicate the mean \pm SD.

むリンカー領域が見いだされた。

13個のエンド型キチナーゼ様遺伝子のうち、family 19に属するもの (ChiN) が1つ見いだされた。一般的に、family 19キチナーゼは植物に分布し、動物と微生物には family 18キチナーゼが分布している (Prakash *et al.*, 2010)。これまで微生物において、family 19キチナーゼは放線菌をはじめ、ごく一部の細菌にしか分布しない希なものである。 *C. shinanonensis* が有する family 19キチナーゼ遺伝子の起源に興味を持たれる。今後、 *C. shinanonensis* が有する15個の遺伝子を大腸菌で発現させ、各組換えタンパク質の機能を調べることにより本株が示す強力なキチン分解能を明らかにしたい。

ナノ結晶を用いた大腸菌の形質転換法 ハイドロゲルと界面形成材料との間に細菌細胞と微細針状素材を置き、すべり摩擦刺激を与えると水分のゲルへの浸透に伴い、摩擦係数は急激に増大する。摩擦係数の増大は微細針状素材のいがくり状化凝集を引き起こし、穿刺中間体とよばれる微細針状素材-細菌複合体が形成され、細菌を穿刺することが明らかとなっている (Yoshida & Saeki, 2004; Yoshida, 2007; Wilharm *et al.*, 2010)。このとき、プラスミドDNAを共存させると大腸菌細胞が穿刺中間体に吸着したDNAを穿刺部位から取込み抗生物質耐性への形質転換が起こる (Yoshida & Ide, 2008)。微細針状素材として、DNA吸着能を有するセピオライト、クリソタイルといった針状結晶を形成する無機の粘土鉱物が適用され、細菌への簡便な遺伝子導入法 (Yoshida *et al.*, 2007) および環境中のアスベスト検知法 (Yoshida & Takebe, 2006) として応用されている。ナノ結晶キチンの形状は、細菌の形質転換に適用された微細針状素材の形状

と類似している (Li *et al.*, 1997; Desai *et al.*, 2008)。そこで、ナノ結晶キチンを用いて、大腸菌細胞へのプラスミドDNA導入による形質転換法の開発を試みた。

ナノ結晶キチン、pUC18 DNA、大腸菌 JM109 株細胞を混合した懸濁液 (容量 100 μ l) を LB+アンピシリン選択寒天培地 (2.5% 寒天) 上で60秒間のすべり摩擦刺激を与えたところ、1晩培養後にアンピシリン耐性コロニーが出現した。混合懸濁液からナノ結晶キチンまたは pUC18 DNA を除いた場合、あるいは、すべり摩擦刺激を与えなかった場合には、いずれもアンピシリン耐性コロニーは出現しなかった。以上の結果は、プラスミドDNAがナノ結晶キチンに吸着し、大腸菌細胞との間で穿刺中間体が形成されたことにより、形質転換が起こったことを示している。一方、ナノ結晶セルロースで同様の実験を行ったところ、形質転換体コロニーはほとんど出現しなかった。ナノ結晶キチン表面には、アセチル基の脱離によって生じたアミノ基に由来する正電荷が分布しているため、プラスミドDNAが静電的相互作用により吸着する。プラスミドDNAを吸着したナノ結晶キチンは、寒天培地上のすべり摩擦場においていがくり状化凝集体となり、大腸菌細胞を穿刺しDNAを細胞内に導入したと考えられる。続いて、ナノ結晶キチン濃度、大腸菌細胞数、すべり摩擦刺激処理時間を種々変更し、形質転換体コロニーが多数出現する条件を求め最適条件を決定した (Fig. 6)。実験方法の項に記載された最適条件では 2.1×10^6 CFU/ μ g DNA という形質転換頻度が得られた。穿刺中間体の細胞は細胞分裂して娘細胞を作るか、細胞破裂する状態へと変化すると考えられる。娘細胞を作る穿刺中間体の数はプラスミドを取込んで抗生物質耐性に形質転換した細胞数に反映される。60秒間のすべり摩擦刺激付与前と付与後のコロニー形成数

の差を調べたところ、約半数の細胞が穿刺中間体から細胞破裂状態に導かれる結果となった (Fig. 6).

大腸菌の形質転換は、対数増殖期の細胞に対して塩化カルシウムなどの薬剤処理でコンピテント化し、熱ショックを与えてDNAを取り込ませる方法が一般的である (Hanahan, 1983; Inoue *et al.*, 1990). このとき形質転換頻度は 10^5 - 10^6 CFU/ μ g pUC18 DNA と報告されている. 今回のナノ結晶キチンとすべり摩擦力を用いた形質転換頻度 (2.1×10^6 CFU/ μ g pUC18 DNA) は従来法と比べて遜色ない. 従来の大腸菌形質転換法と比較すると、1) 定常期の細胞でも使えること、2) 薬剤処理によるコンピテントセル調製の必要がないこと、3) 熱ショック付与が必要ないこと、4) 遺伝子導入とスクリーニング (選択) を同じ寒天培地上で行えること、といった利点がある. ナノ結晶キチンとすべり摩擦力を用いた遺伝子導入法は、キチンの低毒性と合わせて従来法に変わる簡便な遺伝子導入技術と言える. 今後は、他の微生物細胞へ応用可能か汎用性の調査が望まれる.

申請当初は、セルロースおよびキチン由来のナノファイバー、ハイブリッドファイバーを実験材料として利用することを計画していたが、培養実験に必要な量を得ることが困難であった. そこで、代換え品としてナノ結晶を実験材料に用いたが、ナノサイズ化した素材に対する微生物の挙動を調査する目的には適うものであった. ナノファイバーの大量製造技術も早晩には実現すると考えており、今後はナノファイバー、特に二次元に展開した不織布状ナノファイバーの表面において微生物がどのような挙動を示すか調べていきたい.

新属のキチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* が有する15個のキチン分解酵素遺伝子の中には、予備実験の段階であるが、エキソ型・エンド型分解活性を併せ持つ酵素、それ自身にはキチン分解能はないがキチンに吸着し結晶構造を弱めるはたらきがあるタンパク質、をコードするものが見出されている. 今後、バイオマスであるキチンの有効活用という応用の観点から、新規性の高いこれらのタンパク質の機能について調べていきたい.

要 約

ナノ結晶セルロースまたはキチンを炭素源として、各種微生物接種源を用いた集積培養を行った. その結果、通常のセルロース、キチン粉末を炭素源としたときは異なる微生物群が形成されたことより、ナノ結晶の利用によって新たな分解細菌を分離できる可能性

が示された. 土壌、河川水、堀水などの自然環境中において、実際にキチン分解にはたらくと予想される細菌群には未知の細菌種が多く含まれていたが、いずれも難培養性であり分離は困難であった.

異なる環境から回収したキチン表面に吸着した細菌種を混合培養して安定なキチン分解細菌群を構築したところ、新属のキチン分解細菌種1株の分離に成功した. 本菌は1本の極鞭毛を持つグラム陰性の短桿菌であった. 詳細な分類学的試験を行い、*Betaproteobacteria* 門の *Neisseriaceae* 科に位置する新属の細菌として *Chitiniphilus shinanonensis* の学名を提唱し登録した. *C. shinanonensis* の強力なキチン分解系を明らかにするため、15個のキチン分解酵素候補遺伝子を単離し、そのドメイン構造を明らかにした.

選択寒天培地上で、ナノ結晶キチン、大腸菌細胞、プラスミド pUC18 DNA の混合物に、すべり摩擦刺激を与えることにより、アンピシリン耐性の形質転換体コロニーを得ることができた. 最適条件での形質転換頻度は μ g DNA あたり 10^6 のオーダーであり、遺伝子工学実験の実用に十分に耐えるものであった. 定常期の細胞を利用でき、また細胞の前処理や熱ショック処理を必要としない点など、簡便な形質転換法として有用性がある.

本助成で得られた研究成果の報告

口頭発表

- 1) 佐藤一昭, 深町文美, 加藤悠一, 田口悟朗, 下坂 誠 (2008). キチン分解能を有する細菌群集の構築と解析. 第22回キチン・キトサン・シンポジウム (新潟).
- 2) 加藤悠一, 佐藤一昭, 田口悟朗, 野川優洋, 下坂 誠 (2008). 役に立つ微生物を探す-カニの甲羅を分解する細菌集団の謎-. 生物工学会中部支部セミナー (長野).
- 3) 佐藤一昭, 青山英示, 加藤悠一, 野川優洋, 田口悟朗, 横田 明, 下坂 誠 (2009). 上田城堀水より分離したキチン分解能を有する新属細菌種 *Chitiniphilus shinanonensis*. 日本農芸化学会2009年度大会 (福岡).
- 4) Sato, K., Aoyama, H., Kato, Y., Nogawa, M., Taguchi, G., Yokota, A. & Shimosaka, M. (2009). Isolation and characterization of a novel chitinolytic bacterium. 7th East Asian Symposium on Polymers for Advanced Technology (Ueda, Japan).
- 5) 加藤悠一, 佐藤一昭, 青山英示, 野川優洋, 田口悟朗, 下坂 誠 (2009). キチン分解能を有する新属細菌種 *Chitiniphilus shinanonensis* について. 第23回キチン・キトサン・シンポジウム (佐賀).
- 6) Sato, K., Shizume, A., Aoyama, H., Kato, Y., Nogawa, M., Taguchi, G. & Shimosaka, M. (2009). Degradation of chitin by a novel bacterium

Chitiniphilus shinanonensis originated from a bacterial community expressing a chitinolytic activity. The 5th International Conference on Advanced Fiber/Textile (Ueda, Japan).

- 7) 加藤悠一, 佐藤一昭, 青山英示, 鎮目有玲紗, 野川優洋, 田口悟朗, 下坂 誠 (2010). 新属のキチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* のエキソ型キチナーゼについて. 日本農芸化学会2010年度大会 (東京).
- 8) Huang, L., Sato, K., Kato, Y., Nogawa, M., Taguchi, G. & Shimosaka, M. (2010). Cloning and analysis of genes coding for chitinolytic enzymes from the novel chitinolytic bacterium *Chitiniphilus shinanonensis*. 第24回キチン・キトサン・シンポジウム (東京).
- 9) Huang, L., Nogawa, M., Taguchi, G. & Shimosaka, M. (2010). Analysis of genes coding for chitin-degrading enzymes from the bacterium *Chitiniphilus shinanonensis*. International Conference of Future Textile (Ueda, Japan).
- 10) 大槻隆司, 尾塩岳治, 林田 稔, 下坂 誠 (2010). 微小化セルロースを資化する微生物群の菌相解析. 第62回日本生物工学会大会 (宮崎).
- 11) 川上聖史, 白井沙苗, 田口悟朗, 野川優洋, 荒木潤, 下坂 誠 (2011). ナノ結晶キチンを資化する細菌群の解析. 日本農芸化学会2011年度大会 (京都).
- 12) 青山英示, 鎮目有玲紗, 野川優洋, 田口悟朗, 下坂誠 (2011). キチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* に由来する β -N-acetylglucosaminidase の解析. 日本農芸化学会2011年度大会 (京都).
- 13) Huang, L., Kawakami, S., Nogawa, M., Taguchi, G. & Shimosaka, M. (2011). Study on an operon composed of genes coding for chitin-degrading enzymes in the chitinolytic bacterium, *Chitiniphilus shinanonensis*. 日本農芸化学会2011年度大会 (京都).

原著論文

- 1) Sato, K., Kato, Y., Taguchi, G., Nogawa, M., Yokota, A. & Shimosaka, M. (2009). *Chitiniphilus shinanonensis* gen. nov., sp. nov., a novel chitin-degrading bacterium belonging to Betaproteobacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. **55**: 147-153.
- 2) Sato, K., Azama, Y., Nogawa, M., Taguchi, G. & Shimosaka, M. (2010). Analysis of a change in bacterial community in different environments with addition of chitin or chitosan. J. Biosci. Bioeng. **109**: 472-478.
- 3) Sato, K., Kato, Y., Fukamachi, A., Nogawa, M., Taguchi, G. & Shimosaka, M. (2010). Construction and analysis of a bacterial community exhibiting a strong chitinolytic activity. Biosci. Biotechnol. Biochem. **74**: 636-640.
- 4) Huang, L., Garbulewska, E., Sato, K., Kato, Y., Nogawa, M., Taguchi, G. & Shimosaka, M. Isolation of genes coding for chitin-degrading enzymes in the novel chitinolytic bacterium, *Chitiniphilus shinanonensis*, and characterization of a gene coding for a family 19 chitinase. J. Biosci. Bioeng. (in press).
- 5) Mera, A., Araki, J., Ohtsuki, T., Shimosaka, M. &

Yoshida, N. Chitin nanowhiskers mediate transformation of *Escherichia coli* by exogenous plasmid DNA. J. Biotechnol. Biomater. (in press)

その他 (総説など)

- 1) 下坂 誠, 田口悟朗, 野川優洋 (2011). キチン分解酵素遺伝子および該遺伝子によりコードされるキチン分解酵素. 特願 2011-032947.

保存機関に寄託した菌株

本研究で分離した新属のキチン分解細菌菌株は, 以下の学名で登録し保存機関に寄託済みである (Euzeby, 2009).

Chitiniphilus shinanonensis gen. nov., sp. nov. strain SAY3^T
(=NBRC 104970^T=NCIMB 14509^T=DSM 23277^T)

謝 辞

本研究を進めるにあたり, 3年間にわたって研究助成をいただきました公益財団法人発酵研究所ならびに関係諸氏に厚く御礼申し上げます。微小化セルロースの調製に協力いただいた (株) スギノマシンの尾塩岳治, 林田 稔の両氏, およびフレーク状キチンを提供いただいた (株) 共和テクノスに感謝いたします。また, 本研究の遂行にあたっては, 信州大学繊維学部において, 私の研究室に所属した学部生, 大学院生の協力を得ました。特に, 本研究の一部は, 佐藤一昭さんの学位論文研究として行ったものです。そのほか, 黄蘭香, 加藤悠一, 川上聖史, 安座間安仙さんにも多大な協力をいただきました。併せて感謝いたします。

文 献

- Amann, R. I., Ludwig, W. & Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol. Rev. **59**: 143-169.
- Araki, J., Wada, M. & Kuga, S. (2001). Steric stabilization of a cellulose microcrystal suspension by poly(ethylene glycol) grafting. Langmuir **17**: 21-27.
- Clarridge, J. E. III. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. **17**: 840-862.
- Cohen-Kupiec, R. & Chet, I. (1998). The molecular biology of chitin digestion. Curr. Opin. Biotechnol. **9**: 270-277.
- Desai, K., Kit, K., Li, J. & Zivanovic, S. (2008). Morphological and surface properties of electrospun chitosan nanofibers. Biomacromolecules **9**: 1000-1006.

- Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J. P. & Raoult, D. (2000). 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3623-3630.
- Euzeby, J. (2009). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published (Validation List no. 129). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 2129-2130.
- Hanahan, D., (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-80.
- Henrissat, B. & Bairoch, A. (1996). Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316**: 695-696.
- Hodge, J. E. & Hofreiter, B. T. (1962). Determination of reducing sugars and carbohydrates. In *Methods in Carbohydrate Chemistry*. Whistler, R. L. & Wolfrom, M. L. (eds). Academic Press, New York, **1**: 380-394.
- 本宮達也, 谷岡明彦 (2003). ナノファイバーテクノロジーの現状と将来の展望. *繊維と工業*. **59**: 401-406.
- Inoue, H., Nojima, H. & Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Jones, S. W., Dobson, M. E., Francesconi, S. C., Schoske, R. & Crawford, R. (2005). DNA assays for detection, identification, and individualization of select agent microorganisms. *Croat. Med. J.* **46**: 522-529.
- Keyhani, N. O. & Roseman, S. (1999). Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1473**: 108-122.
- Li, J., Revol, J. F. & Marchessault, R. H. (1997). Effect of degree of deacetylation of chitin on the properties of chitin crystallites. *J. Appl. Pol. Sci.* **65**: 373-380.
- Lan, X., Zhang, X., Hu, J. & Shimosaka, M. (2006). Cloning, expression, and characterization of a chitinase from the chitinolytic bacterium *Aeromonas hydrophila* strain SUWA-9. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**: 2437-2442.
- Meibom, K. L., Li, X. B., Nielsen, A. T., Wu, C. Y., Roseman, S. & Schoolnik, G. K. (2004). The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 2524-2529.
- Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. B. (1989). Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high-performance liquid chromatography. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 159-167.
- Prakash, N. A. U., Jayanthi, M., Sabarinathan, R., Kanguane, P., Mathew, L. & Sekar, K. (2010). Evolution, homology conservation, and identification of unique sequence signatures in GH19 family chitinases. *J. Mol. Evol.* **70**: 466-478.
- Revol, J. F. & Marchessault, R. H. (1993). *In vitro* chiral nematic ordering of chitin crystallites. *Int. J. Biol. Macromol.* **15**: 129-335.
- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D. & Handelsman, J. (2004). Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* **38**: 525-552.
- Rodriguez-Valera, F. (2002). Approaches to prokaryotic biodiversity: a population genetics perspective. *Environ. Microbiol.* **4**: 628-633.
- Sasser, M. (1990). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Technical Note 101. Newark.
- Singh, J., Behal, A., Singla, N., Joshi, A., Birbian, N., Singh, S., Bali, V. & Batra, N. (2009). Metagenomics: concept, methodology, ecological inference and recent advances. *Biotechnol. J.* **4**: 480-494.
- Streit, W. R. & Schmitz, R. A. (2004). Metagenomics - the key to the uncultured microbes. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 492-498.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4876-4882.
- Torsvik, V. & Ovreas, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from gene to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**: 240-245.
- Wilharm, G., Lepka, D., Faber, F., Hofmann, J., Kerrinnes, T. & Skiebe, E. (2010). A simple and rapid method of bacterial transformation. *J. Microbiol. Methods* **80**: 215-216.
- 山里一英, 宇田川俊一, 児玉 徹, 森地敏樹 (2001). 微生物の分離法, R & D プランニング, 東京.
- 山下義裕 (2007). エレクトロスピンニング最前線 - ナノファイバー創製への挑戦 -, 繊維社, 大阪.
- Yoshida, N. & Saeki, Y. (2004). Chestnut bur-shaped aggregates of chrysotile particles enable inoculation of *Escherichia coli* cells with plasmid DNA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**: 566-575.
- Yoshida, N. & Takebe, K. (2006). Quantitative detection of asbestos fiber in gravelly sand using elastic body-exposure method. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 827-833.
- Yoshida, N. (2007). Discovery and application of the Yoshida effect: nano-sized acicular materials enable penetration of bacterial cells by sliding friction force. *Recent Pat. Biotechnol.* **1**: 194-201.
- Yoshida, N., Nakajima-Kambe, T., Matsuki, K. & Shigeno, T. (2007). Novel plasmid transformation method mediated by chrysotile, sliding friction, and elastic body exposure. *Anal. Chem. Insights* **2**: 9-15.
- Yoshida, N. & Ide, K. (2008). Plasmid DNA is released from nanosized acicular material surface by low molecular weight oligonucleotides: exogenous plasmid acquisition mechanism for penetration intermediates based on the Yoshida effect. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **80**: 813-821.
- Zhu, H., Qu, F. & Zhu, L. H. (1993). Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.* **21**: 5279-5280.

平成22年度若手研究者助成の研究報告

助成期間：平成22年4月～平成23年3月

サルノコシカケ科の分子系統関係の解明と
新規分類形質を用いた分類体系の構築

早乙女 梢

国立科学博物館植物研究部菌類・藻類研究グループ
〒305-0005 茨城県つくば市天久保4-1-1
現鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源センター
〒680-8553 鳥取県湖山町南4-101

目的：真菌類のサルノコシカケ科は、強力なりグニン・セルロース分解能力を有する種を多く含み、分解者として自然界の物質循環に重要な役割を担う一方で、分離培養が容易であるため、食用や薬用、ダイオキシン分解の酵素利用など、商業・工業的に注目される菌群である。しかしながら、本菌群の分類体系は、環境などで変化しやすい子実体の外形や色、胞子サイズなどに基づいている。そのため種・属概念は曖昧で、菌の利用に不可欠な同定が極めて難しく、研究者間で種や属名が異なるなどの分類学的混乱がしばしば生じ、本菌群の多様性の解明や生物資源としての利用を困難にしている。そこで、本研究では、本菌群より系統的に安定な形質による新規分類形質による本菌群の分類システムを目指し、分子系統関係の解明を行った。

方法：サルノコシカケ科菌の採集とそれらの菌株の確立を行い、新規に収集した子実体標本もしくは培養菌体と既存のサンプルからDNAを抽出した。28S rRNA 遺伝子領域とミトコンドリアの atp6 遺伝子の塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。分子系統樹の作成は近隣結合法および最大節約法を用い、得られた系統樹に検出されたクレード (Clade) の特徴づけを生態的あるいは形態的形質によって行うことで系統と相関のある形質の検出を試みた。

結果・考察：国内各地およびマレーシアで調査を行い、サルノコシカケ科菌を含む198標本99菌株を得た。これらの一部と既存の標本・菌株を合わせた計12属41種78標本を用いて28S rRNA 遺伝子領域及びミトコンドリアの atp6 遺伝子領域による分子系統解析を行った。その結果、28S rRNA 遺伝子領域による系統樹上には3

つの大きなクレード (1~3) が検出された。クレードは1には *Trametes* 属、*Pycnoporus* 属と *Lenzites* 属が含まれ、その中で、*Pycnoporus* 属は単系統群を形成した。クレード2には *Corioloopsis* 属の一部、*Hexagonia* 属、*Daedaleopsis* 属、*Fomitella* 属そして *Microporus* 属が含まれ、クレード3には *Corioloopsis* 属のみが含まれ、またこれらのクレードはそれぞれ近縁であることが明らかになった。これらの結果、クレードの支持は低かったものの、同様の樹形が得られたことからミトコンドリアの atp6 遺伝子領域による解析とも矛盾はなかった。系統と形態の関係については、検出されたクレードを構成する種はいずれも革質の傘肉を有しており、また、各クレードに含まれる種は菌糸細胞壁着色の有無や子実体を構成する菌糸組成が共通していた。このことから、これらの形質はサルノコシカケ科において重要な形質であり、本科の新規分類形質として有効であることが明らかになった。

発酵研究所助成研究報告 第25号【非売品】

平成23年12月6日 印刷

平成23年12月16日 発行

編集責任者 中瀬 崇
編集委員 伊藤忠義, 江崎孝行, 駒形和男, 木村 光
杉山純多, 中桐 昭, 本田武司, 山本憲二
山野尚子, 横田 明
発行人 中濱一雄
発行所 公益財団法人 発酵研究所
大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
TEL. 06-6300-6555
FAX. 06-6300-6814
印刷所 日本印刷出版株式会社
大阪市福島区吉野1丁目2番7号